

**Biochemische Grundlagen des Glyphosatstoffwechsels
in Bakterien der Gattung *Arthrobacter***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von

RÜDIGER PIPKE
aus Dortmund

Bochum 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543113_0033

**Biochemische Grundlagen des Glyphosatstoffwechsels
in Bakterien der Gattung *Arthrobacter***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

von

RÜDIGER PIPKE
aus Dortmund

Bochum 1988

1. Referent:

Prof. Dr. N. Amrhein

2. Referent:

Prof. Dr. W. Hengstenberg

Tag der mündlichen Prüfung:

17. März 1988

Abkürzungsverzeichnis	V
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	4
1. Organismen	4
1.1. Bakterien	4
1.2. Pflanzliche Zellkulturen	4
2. Chemikalien	4
2.1. Radiochemikalien	4
2.2. Phosphonverbindungen	4
2.3. Feinchemikalien	5
3. Medien und Anzuchtbedingungen	5
3.1. Medium für <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	5
3.2. Stickstofffreies Medium für <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	5
3.3. Medium für <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637 und <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
3.4. Medium für alle anderen <i>Arthrobacter</i> -Arten	5
3.5. Medium für <i>Arthrobacter atrocyaneus</i> ohne Phosphorquelle	5
3.6. Medium für pflanzliche Zellkulturen	5
3.7. Anzucht der Bakterien	6
3.8. Anzucht der pflanzlichen Zellkulturen	6
4. Aufschlußverfahren	6
4.1. Aufschluß durch Ultraschall	6
4.2. Aufschluß durch Mörsern mit Aluminiumoxid	6
4.3. Aufschluß durch Lysozym	7
4.4. Dialyse der Rohextrakte	7
5. Enzymmessungen	7
5.1. EPSP-Synthase	7
5.2. Sarcosin-Oxidase	7
5.3. Phosphatase	7
5.4. C-P Lyase	8
6. Proteinbestimmung	8

7. Isolierung von Metaboliten des Glyphosatabbaus aus Bakterien und Medien	8
7.1. Nachweis von Sarcosin in Extrakten von <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	8
7.2. Nachweis von Glyphosat in Extrakten von <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	9
7.3. Nachweis von Aminomethylphosphonsäure (AMPA) in Medien von <i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	9
8. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie	9
8.1. Reinigung von ^{14}C -Glyphosat	9
8.2. Bestimmung von Shikimisäure und Shikimisäure 3-Phosphat	10
9. Dünnschichtchromatographie	10
10. Aminosäurenanalyse	10
11. Dansylierung von Aminomethylphosphonsäure (AMPA)	10
12. Aufnahmeversuche	11
12.1. Glyphosataufnahme in Bakterien	11
12.2. Glyphosataufnahme in pflanzliche Zellkulturen	11
13. Mutagenese	11
14. Messung von $^{14}\text{CO}_2$	11
15. Hemmung der Proteinbiosynthese in <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1 durch Chloramphenicol	12
16. Radiometrische Methoden	12
17. Mikroskopie	12
17.1. Lichtmikroskopie	12
17.2. Fixierung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie	12
17.3. Elektronenmikroskopie	12
18. Morphologische Untersuchung von <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	13
19. Zellwandanalyse bei <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	13
III. Zusammenstellung der verwendeten Phosphonverbindungen	14
IV. Ergebnisse	15
1. Identifizierung eines glyphosatabbauenden Bakteriums als <i>Arthrobacter</i> Species	15
1.1. Herkunft des Stammes	15

1.2. Charakterisierung des Isolats nach grundlegenden physiologischen Eigenschaften	15
1.3. Untersuchungen zum Formwechsel des isolierten Stammes	15
1.4. Zellwandanalyse des isolierten Stammes	15
1.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	17
2. Einfluß von Glyphosat auf das Wachstum von Bakterien der Gattung <i>Arthrobacter</i>	19
2.1. Wachstumshemmung durch Glyphosat	19
2.2. Abbau von Glyphosat und anderen Phosphonoverbindungen	20
2.3. Einfluß von Glyphosat auf das Wachstum von <i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	22
2.4. Vergleich der Zellerträge bei Wachstum mit Phosphat und Glyphosat	23
3. Abbau von Glyphosat durch <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	23
3.1. Einfluß von Sarcosin auf den Stoffwechsel von [3^{14}C]Glyphosat	24
3.2. Identifizierung von Sarcosin als Produkt der Glyphosatspaltung	25
4. Untersuchungen zur Spaltung der Kohlenstoff-Phosphor Bindung von Glyphosat	26
4.1. Nachweis einer C-P Lyase Aktivität <i>in vitro</i>	27
4.2. Nachweis einer C-P Lyase Aktivität <i>in vivo</i>	27
4.3. Messung der C-P Lyase Aktivität in permeabilisierten Zellen	28
4.4. Bestimmung des K_m -Wertes für die C-P Lyase aus <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	29
5. Glyphosatabbau durch <i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	30
5.1. Isolierung von Aminomethylphosphonsäure als Abbauprodukt von Glyphosat	31
5.2. Identifizierung von Aminomethylphosphonsäure	31
5.3. Glyphosatabbau in Gegenwart von Orthophosphat	33
5.4. Verstoffwechselung von Aminomethylphosphonsäure	34
6. Einfluß von Glyphosat auf die Regulation der Sarcosin-Oxidase	35
7. Untersuchungen zur Glyphosataufnahme bei <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	36
7.1. Induktion der Glyphosataufnahme	36
7.2. Rolle der Proteinbiosynthese bei der Induktion des Aufnahmesystems	38
7.3. Einfluß von Glyphosat auf die Regulation der alkalischen Phosphatase	38
7.4. Glyphosataufnahme bei <i>Escherichia coli</i> und <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
7.5. Glyphosataufnahme bei <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1 in Abhängigkeit vom pH-Wert	39
7.6. Einfluß von divalenten Metallionen auf den Glyphosattransport	41
7.7. Nachweis von Glyphosat in Zellen von <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	41
7.8. Vergleichende Untersuchungen zur Regulation von Glyphosataufnahme und Glyphosatabbau	42

8. Die Nutzung von Glyphosat als Stickstoffquelle	44
8.1. Mutagenese von <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1	44
8.2. Wachstum von <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1/Nit-1	45
8.3. Zellerträge bei Wachstum mit Glyphosat und Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle	46
8.4. Wachstum von <i>A.</i> sp. GLP-1/Nit-1 mit anderen Aminophosphonsäuren als Stickstoffquelle	46
9. Vergleich der Glyphosat- und Phosphataufnahme bei <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1 und der Mutante <i>Arthrobacter</i> sp. GLP-1/Nit-1	47
9.1. Kinetik der Glyphosataufnahme von <i>A.</i> sp. GLP-1/Nit-1 in Abhängigkeit von der Phosphor- und Stickstoffquelle im Anzuchtmedium	47
9.2. Vergleich der Phosphataufnahme von <i>A.</i> sp. GLP-1 und <i>A.</i> sp. GLP-1/Nit-1	48
9.3. Wachstum von <i>A.</i> sp. GLP-1 und <i>A.</i> sp. GLP-1/Nit-1 mit limitierenden Phosphatkonzentrationen	54
Anhang: Glyphosataufnahme pflanzlicher Zellkulturen	56
V. Diskussion	57
VI. Zusammenfassung	70
VII. Literatur	72

AEP	Aminoethylphosphonsäure
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
ATCC	American Type Culture Collection
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTP	Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure)
EPSP	5-Enolpyruvylshikimisäure 3-Phosphat
FG	Feuchtgewicht
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
NMR	Kernresonanz
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
S-3-P	Shikimisäure 3-Phosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

Enzyme

5-Enolpyruvylshikimisäure 3-Phosphat Synthase	E.C. 2.5.1.19
Kohlenstoff-Phosphor Lyase	E.C. 3.1.11.-
Phosphonoacetaldehyd Hydrolase	E.C. 3.1.11.1
Sarcosin-Oxidase	E.C. 1.5.3.1

I. Einleitung

Die zunehmende Verbreitung von synthetischen Organophosphonaten, Verbindungen mit einer stabilen Kohlenstoff-Phosphor (C-P) Bindung, fördert Untersuchungen zur Persistenz dieser Verbindungsklasse in der Umwelt. Die Stabilität der C-P Bindung gegen saure und alkalische Hydrolyse sowie gegen enzymatische Spaltung führte zur Entwicklung von verschiedensten Pestiziden, Antibiotika, Komplexbildnern, chemischen Kampfmitteln, Substanzen zur Reduzierung der Entflammbarkeit, Detergenzien, Katalysatoren usw. (BLACKBURN, 1981; DRAKE und CALAMARI, 1983). Das breite Spektrum dieser Verbindungen und die damit in die Umwelt eingebrachten Mengen verdeutlichen die Bedeutung, die der Erforschung des Metabolismus von Organophosphonaten zukommt. Die Biochemie der Organophosphonate ist nicht nur bei synthetischen Verbindungen wenig verstanden; auch bei natürlich vorkommenden Organophosphonaten sind die Kenntnisse über Biosynthese und Abbau gering.

Die am besten untersuchte natürlich vorkommende Phosphonoverbindung ist 2-Aminoethylphosphonsäure (2-AEP). Diese Verbindung wurde 1959 - 13 Jahre nach der ersten Synthese von 2-AEP durch FINKELSTEIN (1946) - von HORIGUCHI und KANDATSU aus Ciliaten isoliert. Die Biosynthese von 2-AEP wurde hauptsächlich an *Tetrahymena* untersucht. Sie verläuft über Phosphonopyruvat und Phosphonoacetaldehyd zu 2-Aminoethylphosphonsäure (WARREN, 1968; HORIGUCHI, 1972). Bei der Untersuchung des Abbaus von 2-AEP gelang es zum ersten Mal ein Enzym zu isolieren, welches eine Phosphonobindung spalten kann (LA NAUZE et al., 1970). Das als Phosphonatase bezeichnete Enzym wurde aus *Bacillus cereus* angereichert und war hochspezifisch für das Substrat Phosphonoacetaldehyd, welches nach Transaminierung von 2-AEP gebildet wurde. Die Produkte der Phosphonatase-Reaktion sind Acetaldehyd und Phosphat. Trotz vielfacher dokumentierter Bemühungen gelang es bisher nicht, weitere Enzyme, die eine C-P Bindung spalten können, zu isolieren. Dabei ist sicher, daß eine Reihe von Mikroorganismen in der Lage sind, mit Phosphonaten als einziger Phosphorquelle zu wachsen (SMITH, 1983), und somit die Phosphonobindung spalten können. Bei keinem Organismus außer *Bacillus cereus* war ein Nachweis einer C-P spaltenden Aktivität *in vitro* möglich. Das Enzym Phosphonatase bleibt damit das einzige bekannte Enzym, welches den als Phosphonat gebundenen Phosphor freisetzen kann.

Mit der Entdeckung von 2-AEP durch HORIGUCHI und KANDATSU (1959) begann die Untersuchung der Rolle von Phosphonoverbindungen in der Natur. Die Zahl der Organismen, in denen Phosphonate nachgewiesen wurden, wuchs schnell. Bisher konnten in etwa 80 Organismen aus 8 Abteilungen Phosphonoverbindungen identifiziert werden. Neben 2-AEP wurden weitere natürliche Phosphonate entdeckt. Wichtige Vertreter dieser Verbindungen sind 2-Amino-3-phosphonopropionsäure, Fosfomycin und N-methyl Derivate von 2-AEP. Die biologische Bedeutung der Phosphonoverbindungen ist unterschiedlich. So konnten ROUSER et al. (1963) und HORI et al. (1964) Ceramid-2-Aminoethylphosphonsäure (CAEP) isolieren, das erste Lipid mit der C-P Bindung. Die



Bedeutung von Phosphonaten im Lipidstoffwechsel wurde durch die Isolierung von Phosphonoanalogen des Ethanolamins-, Serin- und Cholinphosphats, den wichtigsten Stickstoffhaltigen Bestandteilen von Phospholipiden, bestätigt. Der Begriff der Phosphonolipide wurde geprägt. Neben der Funktion im Lipidstoffwechsel haben Phosphonate eine große Bedeutung als Antibiotika. Natürliche Substanzen mit antibakterieller Wirkung wie z. B. 1,2-Epoxypropylphosphonsäure (Fosfomycin) und 3-(N-acetyl-N-hydroxyamino)propylphosphonsäure wurden aus *Streptomyces* Arten isoliert. Demgegenüber stehen synthetische Verbindungen wie 1-Aminoethylphosphonsäure (1-AEP), ein Bestandteil des Dipeptids Alafosfalin (ALLEN et al., 1978). Wegen ihrer antiviralen Eigenschaften fanden Phosphonoameisensäure und Phosphonoessigsäure eine weite Verbreitung. Die Beobachtung, daß synthetische α -Aminophosphinsäuren biologische Aktivität besitzen, führte zur Entwicklung von 2-Amino-4-methylphosphinobuttersäure durch MASTALERZ (1959). Diese Substanz ist ein starker kompetitiver Hemmstoff der Glutamin-Synthetase und wurde später als Bestandteil eines natürlichen Tripeptidantibiotikums identifiziert und als Phosphinothricin bezeichnet (BAYER et al., 1972).

Wie schon erwähnt ist der Anwendungsbereich synthetischer Phosphonate sehr vielfältig. Eine der wichtigsten Phosphonoverbindungen ist Glyphosat (N-(Phosphonomethyl)glycin), die aktive Komponente des Breitbandspektrum-Herbizids Roundup (Strukturformel unter III). Glyphosat wurde 1971 als Herbizid von der Monsanto Company eingeführt (BAIRD et al., 1971) und entwickelte sich zu einem der umsatzstärksten Herbizide überhaupt. Es war das erste Herbizid, welches seine Wirkung durch die Hemmung der Biosynthese essentieller Aminosäuren erzielt. Später folgten die Sulfonylharnstoffe (LEVITT et al., 1981) und die Imidazolinone (SHANER et al., 1984).

Glyphosat ist für Pflanzen und Bakterien, nicht aber für Insekten und Vertebraten toxisch (FRANZ, 1979). Dies ist sicherlich ein Grund für den Erfolg des Herbizids. Ein anderer Grund für die weite Verbreitung von Glyphosat ist der schnelle Abbau des Herbizids im Boden (RUEPPEL et al., 1977). Erste Hinweise auf den Wirkort von Glyphosat erhielt JAWORSKI (1972), der eine Beeinflussung der Biosynthese aromatischer Aminosäuren durch das Herbizid feststellte. Der Angriffspunkt von Glyphosat ist die 5-Enolpyruvylshikimisäure 3-Phosphat (EPSP) Synthase, das sechste Enzym der Biosynthese aromatischer Aminosäuren (STEINRÜCKEN und AMRHEIN, 1980). Die EPSP-Synthase katalysiert den reversiblen Transfer eines Enolpyruvylrestes von Phosphoenolpyruvat auf die 5-Hydroxylgruppe von Shikimisäure 3-Phosphat unter Bildung von 5-Enolpyruvylshikimisäure 3-Phosphat und anorganischem Phosphat. Glyphosat hemmt die Reaktion kompetitiv in Bezug auf das Substrat Phosphoenolpyruvat und unkompetitiv im Hinblick auf Shikimisäure 3-Phosphat (AMRHEIN, 1986).

Neben proteinchemischen Arbeiten an der EPSP-Synthase aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen wurden molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt. Verschiedene für das Enzym kodierende Gene wurden kloniert und die vollständige Aminosäuresequenz für die EPSP-Synthasen aus *Escherichia coli* (DUNCAN et al., 1984) und *Salmonella typhimurium* (STALKER et al., 1985) aus der Nukleotidsequenz abgeleitet. Bei beiden Organismen besteht das Enzym aus 427 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 46100 Dalton. Die Transformation von *E. coli* mit Multicopy-Plasmiden, die das Gen für die EPSP-Synthase trugen, ermöglichte die Isolierung großer Mengen des Enzyms.

Die detaillierte Untersuchung der EPSP-Synthase umfaßte auch die Beschreibung von Resistenzmechanismen gegenüber Glyphosat. So wurden bei den Bakterien *Salmonella typhimurium* (COMAI et al., 1983) und *Aerobacter aerogenes* (SCHULZ et al., 1984) glyphosatinsensitive EPSP-Synthasen charakterisiert. Das Enzym aus *A. aerogenes* ist durch eine verringerte Affinität zu den Substraten und dem Inhibitor gekennzeichnet. Die Überproduktion des Enzyms als Toleranzmechanismus wurde sowohl bei Bakterien als auch bei Pflanzen nachgewiesen. Beispiele für eine Überakkumulation der EPSP-Synthase finden sich bei den Bakterien *Aerobacter aerogenes* (AMRHEIN et al., 1983) und *Escherichia coli* (ROGERS et al., 1983) und bei den pflanzlichen Zellkulturen von *Corydalis sempervirens* (AMRHEIN et al., 1983), *Daucus carota* (NAFZIGER et al., 1984) und *Petunia hybrida* (STEINRÜCKEN et al., 1986).

Der Abbau von Glyphosat durch Bakterien wurde zum erstenmal 1983 von MOORE et al. beschrieben. Sie isolierten einen Stamm der Gattung *Pseudomonas*, der die C-P Bindung in Glyphosat spalten und somit das Herbizid als Phosphorquelle nutzen konnte. Weitere Stämme der Gattungen *Pseudomonas* und *Alcaligenes* konnten von TALBOT et al. (1984) isoliert werden. Erste Hinweise auf den Stoffwechsel von Glyphosat in Bakterien wurden von PIPKE (1984) und JACOB et al. (1985) erhalten. Die Autoren konnten durch radioaktive Fütterungsversuche (PIPKE) bei *Arthrobacter* und durch NMR-Spektroskopie (JACOB et al.) bei *Pseudomonas* die Beteiligung des C₁-Stoffwechsels am Abbau von Glyphosat demonstrieren. Andere Mechanismen der Glyphosat-resistenz wurden bisher nicht beschrieben. Dabei sind neben den schon dargelegten Beispielen

- verringerte Affinität von Glyphosat zur EPSP-Synthase (insensitives Enzym)
- Überakkumulation der EPSP-Synthase (sensitives Enzym)
- Abbau von Glyphosat

die verminderte Aufnahme von Glyphosat und der Anstieg der Phosphoenolpyruvat-Konzentration (Glyphosat hemmt die EPSP-Synthase kompetitiv in Bezug auf Phosphoenolpyruvat) denkbar.

Die vorliegende Arbeit soll Beiträge zum Metabolismus von Glyphosat durch Bakterien liefern und verschiedene Aspekte der Regulation näher beschreiben.

Es werden unterschiedliche Stoffwechselwege des Herbizids vorgestellt, ein Aufnahmesystem für Glyphosat beschrieben und durch die Charakterisierung einer Mutante des Glyphosatstoffwechsels Parameter der Regulation von Aufnahme und Abbau untersucht. Die Kenntnisse über die Biochemie der Phosphonverbindungen werden erweitert und Voraussetzungen für erste ökologische Fragestellungen des Glyphosatabbaus ermöglicht.

II. Material und Methoden

1. Organismen

1.1. Bakterien

Arthrobacter sp. GLP-1 wurde am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum, isoliert. Der Stamm wurde im Laufe eines Screening-Programms zur Isolierung glyphosatabbauender *Klebsiella pneumoniae* Kulturen als Kontamination entdeckt und als *Arthrobacter* Species identifiziert.

Die Stämme *Arthrobacter paraffineus* (ATCC 21298) und *Escherichia coli* (ATCC 9637) stammten von der American Type Culture Collection, Rockville, USA. Die Stämme *Arthrobacter* sp. (DSM 312, DSM 20389), *Arthrobacter atrocyaneus* (DSM 20217), *Arthrobacter globiformis* (DSM 20124), *Arthrobacter histidinovorans* (DSM 20115), *Arthrobacter oxydans* (DSM 420, DSM 20120) sowie *Arthrobacter variabilis* (DSM 20132) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen, bezogen. Der Wildtyp von *Klebsiella pneumoniae* wurde der Sammlung des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum, entnommen.

1.2. Pflanzliche Zellkulturen

Zellsuspensionskulturen von *Catharanthus longifolius* und *Nicotiana glauca* stammten vom Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Ruhr-Universität Bochum.

2. Chemikalien

2.1. Radiochemikalien

[3-¹⁴C] Glyphosat (344.1 MBq/mMol), L-[U-¹⁴C] Alanin (6,1 GBq/mMol) und ³²Orthophosphat (113 TBq/mAtom) stammten von der Firma Amersham-Buchler, Braunschweig.

2.2. Phosphonoverbindungen

Glyphosat (freie Säure, 99,7 % rein), Diethylentriaminpenta(methylenphosphonsäure) (DETPP), Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure) (EDTP), Hydroxyethyliden-1,1-diphosphonsäure (HEDP), N-Methylethylendiamintri(methylenphosphonsäure) (N-MEDTP) stammten von der Monsanto Agricultural Products Co., St. Louis, USA. Hydroxymethylphosphonsäure und Ethylphosphonsäure wurden von der Firma Ventron, Karlsruhe, Benzolphosphonsäure und Phosphonoessigsäure von der Firma Aldrich, Steinheim und 3-Phosphonopropionsäure sowie Methandiphosphonsäure von der Firma Fluka, Neu-Ulm, bezogen. Aminomethylphosphonsäure, 1- und 2-Aminoethylphosphonsäure, Fosfomycin Phosphonoameisensäure, 1- und 4-Aminobutylphosphonsäure, 2-Amino-3-phosphonopropionsäure sowie 2-Amino-4-phosphonobuttersäure stammten von der Firma Sigma, München.

2.3. Feinchemikalien

Die Bezugsquellen der übrigen Feinchemikalien werden bei Erwähnung im Text angegeben.

3. Medien und Anzuchtbedingungen

3.1. Medium für *Arthrobacter* sp. GLP-1

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurde *Arthrobacter* sp. GLP-1 in modifiziertem Medium nach WINKLER und DE HAAN (1948) angezogen. Das Medium enthielt statt des Phosphatpuffers 100 mM Tris/HCl pH 7,2 als Puffer und war mit 1 % (w/v) Glukose sowie 0,02 % (v/v) Spurenelementelösung nach AMRHEIN und FILNER (1973) supplementiert. Sofern im Text nicht anders angegeben, enthielt das Medium 1 mM Glyphosat als Phosphorquelle.

3.2. Stickstofffreies Medium für *Arthrobacter* sp. GLP-1

Zur Selektion nach Mutanten von *Arthrobacter* sp. GLP-1, die Glyphosat als Stickstoffquelle nutzen konnten, wurde das unter 3.1. beschriebene Medium verwendet, wobei der 100 mM Tris/HCl Puffer pH 7,2 durch einen Maleinsäure/NaOH Puffer pH 6,5 gleicher Konzentration ersetzt wurde.

3.3. Medium für *Escherichia coli* ATCC 9637 und *Klebsiella pneumoniae* wt

Die beiden Stämme wurden in dem unter 3.1. aufgeführten Medium mit 1 mM Orthophosphat als Phosphorquelle angezogen.

3.4. Medium für alle anderen *Arthrobacter*-Arten

Das Medium wurde so entwickelt, daß alle der unter 1.1. beschriebenen *Arthrobacter* Arten unter definierten Bedingungen angezogen werden konnten. Ein Liter des Mediums enthielt: 1 g Glucose x H_2O , 10 g NH_4Cl , 0,5 g KNO_3 , 1 g KH_2PO_4 , 0,1 g NaCl, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ sowie 0,02 % (v/v) Spurenelementelösung (AMRHEIN und FILNER, 1973) und 0,02 % (v/v) Vitaminlösung nach DIFCO (1972) bei einem pH-Wert von 6,8.

3.5. Medium für *Arthrobacter atrocyaneus* ohne Phosphorquelle

Bei Versuchen zum Glyphosatabbau durch *Arthrobacter atrocyaneus* wurde das unter 3.4. beschriebene Medium verwendet. KH_2PO_4 wurde weggelassen und 50 mM Tris/HCl pH 7,2 als Puffer ergänzt. Die jeweiligen Phosphorquellen werden im Text erwähnt.

3.6. Medium für pflanzliche Zellkulturen

Für die Anzucht der Zellkulturen wurde Medium nach LINSMAIER und SKOOG (1965) supplementiert mit 1,0 μM 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure und 0,1 μM 1-Naphthylthylthioessigsäure eingesetzt.

3.7. Anzucht der Bakterien

Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 30 °C auf einem Wasserbadschüttler mit 200 Upm. Zum Animpfen wurden Kulturen der stationären Wachstumsphase benutzt, wobei das Volumen des Inokulums 1 % des Gesamtvolumens betrug. Die Zugabe der Phosphonverbindungen zu den autoklavierten Medien erfolgte nach Filtersterilisation. Von allen Medien wurden nach Bedarf Festmedien mit 1,5 % w/v Bacto Agar (Difco) bzw. 1,5 % w/v Sea Plaque Agarose (FMC) angelegt.

3.7. Anzucht der pflanzlichen Zellkulturen

Die Kulturen wurden bei 23 °C im Dauerlicht (600 Lux) mit 100 Upm auf einem Rotationsschüttler angezogen.

4. Aufschlußverfahren

4.1. Aufschluß durch Ultraschall

Dieses Aufschlußverfahren wurde zur Messung der Aktivitäten folgender Enzyme benutzt: EPSP-Synthase, Phosphatase, Sarcosin-Oxidase und C-P Lyase. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C durchgeführt. Eine 100 ml Kultur von Bakterien der logarithmischen Wachstumsphase wurden durch Zentrifugation (5 Minuten, 12000 g) pelletiert, mit 1 ml Aufschlußpuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,2; 5 mM β -Mercaptoethanol; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert und unter Kühlung im Eisbad aufgeschlossen. Der Aufschluß erfolgte mittels eines BRANSON-SONIFIER S 21 für 6 x 10 sec mit je 50 sec Pause. Der Rohextrakt wurde erneut zentrifugiert (15 Minuten, 15000 g) und für die entsprechenden Messungen eingesetzt.

Der Aufschlußpuffer zum Nachweis einer C-P Lyase Aktivität wurde zusätzlich durch die Zugabe von SH-Reagenzien (5 mM Dithiothreitol DTT), Komplexbildnern (1 mM Ethylendiaminotetraessigsäure EDTA), divalenten Metallionen (1 mM $MgCl_2$), Detergenz (1 % Triton X 100, Sigma) und Ersatz des Tris-Puffers durch 200 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes) pH 6,0 variiert.

Die Aufschlußverfahren nach 4.2. und 4.3. wurden nur zum Nachweis der C-P Lyase eingesetzt.

4.2. Aufschluß durch Mörsern mit Aluminiumoxid

Bakterien einer 300 ml Kultur wurden durch Zentrifugation pelletiert, mit 1 ml Aufschlußpuffer (4.1.) aufgenommen und in einem gekühlten Mörser mit soviel Aluminiumoxid (Alcoa A 305, Aluminum Company of America) versetzt, bis eine zähe Paste entstand. Der Aufschluß dauerte ca. 20 Minuten. Bei Verflüssigung der Masse durch freiwerdenden Zellsaft wurde Aluminiumoxid ergänzt, so daß die Konsistenz der Masse erhalten blieb. Nachdem kein weiterer Zellsaft freigesetzt werden konnte, wurde 5 Minuten bei 2500 g zentrifugiert um das Aluminiumoxid abzutrennen. Zellwandreste und nicht aufgeschlossene Zellen wurden danach durch Zentrifugation bei 15000 g (15 Minuten) entfernt.

4.3. Aufschluß durch Lysozym

Der Aufschluß mußte durch Variation aller Komponenten optimiert werden. Es stellte sich heraus, daß Magnesium- und Natrium-Ionen für den Aufschluß nicht nötig waren. Dagegen verbesserte die Zugabe von EDTA das Ergebnis. Ein vollständiger Aufschluß konnte nicht erzielt werden. Die besten Ergebnisse wurden mit folgender Zusammensetzung erreicht: 0,1 ml Lysosym (5 mg/ml, Boehringer); 0,1 ml EDTA (50 mg/ml); 0,3 ml H₂O; 0,5 ml Bakteriensuspension (80 mg FG/ml in 50 mM Tris/HCl pH 7,2). Der Aufschluß erfolgte über 2 Stunden bei 37 °C und wurde durch die Freisetzung von Protein kontrolliert. Ein Aufschluß über Nacht bei 4 °C brachte keine meßbare Freisetzung von Protein.

4.4. Dialyse von Rohextrakten

Die nach 4.1. bis 4.3. hergestellten Rohextrakte wurden über Nacht gegen einen tausendfachen Überschuß von 50 mM Tris/HCl, pH 7,2 mit 5 mM β -Mercaptoethanol dialysiert und für Messungen der C-P Lyase eingesetzt.

5. Enzymmessungen

Alle Enzymmessungen wurden in 1,5 ml Polyethylenreaktionsgefäßen durchgeführt.

5.1. EPSP-Synthase

Die Bestimmung der EPSP-Synthase erfolgte nach einer Methode von STEINRÜCKEN und AMRHEIN (1984) über die Bestimmung des freigesetzten Orthophosphats nach der Methode von LANZETTA et al. (1979). Im Gegensatz zu dem bei STEINRÜCKEN und AMRHEIN beschriebenen Verfahren betrugen die Substratkonzentrationen 2 mM und die Konzentration des Phosphataseinhibitors Natriumwolframat 20 μ M.

5.2. Sarcosin-Oxidase

Die Messung der Sarcosin-Oxidase erfolgte modifiziert nach SUZUKI (1981). Der Testansatz enthielt 80 mM Tris/HCl pH 7,2, 20 mM Sarcosin und 25–50 μ l Rohextrakt. Das Gesamtvolumen betrug 125 μ l. Kontrollen enthielten entweder kein Substrat oder 200 mM Natriumacetat bzw. 200 mM Methoxyacetat als Hemmstoff der Reaktion. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und wurde durch die Zugabe von 125 μ l 0,5 N Essigsäure beendet. Die Bestimmung des freigesetzten Formaldehyds erfolgte nach NASH (1953).

5.3. Phosphatase

Die Aktivität alkalischer Phosphatasen wurde nach WALTER und SCHÜTT (1970) bestimmt.

5.4. C-P Lyase

5.4.1. Messung der C-P Lyase Aktivität *in vitro*

Zu 30 μl eines nach 4. hergestellten Rohextraktes wurden 10 μl ^{14}C -Glyphosat (12 nMol mit 4180 Bq) hinzugefügt und 30 bis 60 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 μl N HCl abgestoppt, ausgefallenes Protein abzentrifugiert (1 Minute 15000 g) und Proben des Überstandes für die Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

5.4.2. Messung der C-P Lyase Aktivität *in vivo*

Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 40 μl 10 mM Natriumacetat, 50 μM ^{14}C -Glyphosat (180 MBq/mMol), 50 mM Tris/HCl pH 7,2 und eine Bakterien-suspension mit 5 bis 10 $\times 10^9$ Zellen/ml. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 30 °C und wurde durch Zentrifugation der Bakteriensuspension (1 Minute 15000 g) beendet. Der Überstand wurde abgenommen und für die Chromatographie eingesetzt. Änderungen dieser Versuchsbedingungen werden im Text erwähnt.

5.4.3. Messung der C-P Lyase Aktivität in permeabilisierten Zellen

Durch Zugabe von 2 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in den Inkubationsansatz (5.4.2.) wurde erreicht, daß niedermolekulare Metabolite (in diesem Fall Sarcosin) leichter in das Medium diffundieren konnten. Zusätzlich wurden Zellen nach einer Methode von KORNBERG und REEVES (1972) mit einem Ethanol/Toluol Gemisch und nach einer Methode von WHITE et al. (1964) mit Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) permeabilisiert.

6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach einer Methode von BRADFORD (1976) in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml durchgeführt.

7. Isolierung von Metaboliten des Glyphosatabbaus aus Bakterien und Medien

7.1. Nachweis von Sarcosin in Extrakten von *Arthrobacter* sp. GLP-1

Bakterien aus 60 ml Kulturen (Medium nach 3.1.) wurden in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase pelletiert und im gleichen Volumen Minimalmedium, welches 183 KBq ^{14}C -Glyphosat (30 μM) und entsprechende Konzentrationen Sarcosin enthielt, resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubation (3.7.) wurden die Bakterien abzentrifugiert und Extrakte wie unter 4.1. beschrieben hergestellt. Der Rohextrakt wurde mit Aceton auf 80 % (v/v) aufgefüllt, Proteine über Nacht bei -20 °C ausgefällt und pelletiert. Der Überstand wurde zur Trockne im Luftstrom eingengt, mit 200 μl H_2O aufgenommen und für die weitere Analyse mittels Dünnschichtchromatographie, Aminosäurenanalyse und enzymatischen Abbau eingesetzt.

7.2. Nachweis von Glyphosat in Extrakten von *Arthrobacter* sp. GLP-1

Bakterien der logarithmischen Wachstumsphase (Medium nach 3.1.) wurden pelletiert und mit 100 mM Tris/HCl pH 7,2 auf 2×10^{10} Zellen pro ml eingestellt. Zu 100 μ l der Suspension wurden 17 KBq ^{14}C -Glyphosat (40 μM) in einem Gesamtvolumen von 200 μ l hinzugefügt und 5 Minuten bei 30 °C inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und 5 mal mit 0,5 ml nicht markiertem Glyphosat (25 mM) gewaschen, so daß die Radioaktivität im Überstand geringer als 50 cpm/100 μ l war. Anschließend wurden die Proben aufgeschlossen (4.1.) und niedermolekulare Bestandteile isoliert (7.1.).

7.3. Nachweis von Aminomethylphosphonsäure in Medien von *Arthrobacter atrocyaneus*

Die Bakterien wurden in 10 ml Kulturen (3.5.) mit 40 MBq/mMol ^{14}C -Glyphosat (50 μM) angezogen. Für die Analyse von radioaktiven Metaboliten wurden Proben des Kulturüberstandes auf Cellulose-Platten chromatographiert (Laufmittel I), radioaktive Banden mit H_2O eluiert und für eine weitere Analyse eingesetzt.

8. Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie

8.1. Reinigung von ^{14}C -Glyphosat

Das radioaktive Glyphosat wurde mittels einer Anionenaustauschchromatographie an einer Mono Q HR 5/5 Säule (Pharmacia) mit einer HPLC Anlage von LKB gereinigt. Die Anlage bestand aus Controller (LKB 2152), Detector (LKB 2150), Pumpe (LKB 2150) und Recorder (LKB 22100). Die Pumpgeschwindigkeit betrug 1 ml/min mit 20 mM Tris/HCl, pH 7,2 als Laufpuffer. Zur Reinigung wurden 0,4 MBq ^{14}C -Glyphosat aufgegeben, mit 7 ml Laufpuffer nachgewaschen und mit einem linearen KCl-Gradienten

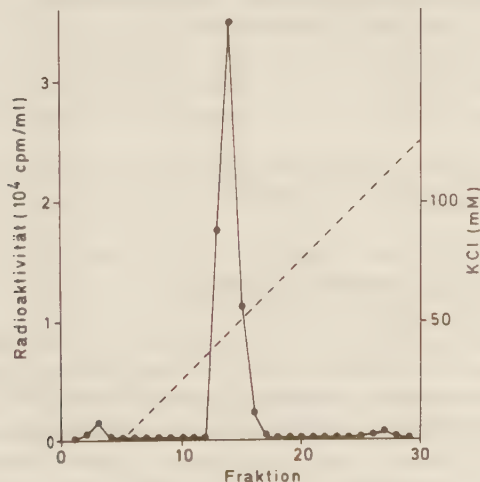


Abb.1. Elutionsprofil der Reinigung von ^{14}C -Glyphosat an Mono Q HR 5/5

von 0 bis 200 mM KCl in 20 mM Tris/HCl pH 7,2 bei einer Steigung von 5 mM/min eluiert. Die Fraktionsgröße betrug 0,5 ml.

Das radioaktive Glyphosat eluierte zwischen 35 und 55 mM KCl (Abb.1). Die Ausbeute betrug 88 % der eingesetzten Radioaktivität. Die übrige Radioaktivität verteilte sich auf zwei Verunreinigungen und auf Radioaktivität, die erst allmählich bei hohen KCl-Konzentrationen (200 mM) eluierte. Die radiochemische Reinheit des radioaktiven Glyphosats wurde mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie nach RUEPPEL et al. (1977) überprüft.

8.2. Bestimmung von Shikimisäure und Shikimisäure 3-Phosphat

Die Messung von Shikimisäure und Shikimisäure 3-Phosphat erfolgte nach einer Methode von HOLLÄNDER-CZYTKO und AMRHEIN (1983).

9. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden 20 x 20 cm Cellulose-Platten der Firma Merck (Schichtdicke 0,1 mm) verwendet.

Laufmittel I: iso-Buttersäure - H_2O - 1-Propanol - konz. NH_4OH - 2-Propanol - 1-Butanol (500:95:70:20:15:15 v/v) mit 0,24 g EDTA pro Liter (nach RUEPPEL et al., 1977)

Laufmittel II: Methanol - H_2O (80:20 v/v)

Laufmittel III: Ethanol - H_2O - Trichloressigsäure - Essigsäure - konz. NH_4OH (550:350:32:20:25 v/v; nach PUTNAM, 1976)

Laufmittel IV: 1-Butanol - Aceton - Diethylamin - H_2O (30:30:6:15 v/v)

Laufmittel V: Ethylacetat - Pyridin - H_2O (80:20:10 v/v)

10. Aminosäurenanalyse

Die Analyse von Aminosäuren und die Verteilung der Radioaktivität wurde nach einer Methode von HOLLÄNDER et al. (1979) durchgeführt.

11. Dansylierung von Aminomethylphosphonsäure (AMPA)

Aminomethylphosphonsäure wurde nach Auftrennung über Dünnschichtchromatographie mit H_2O eluiert und nach einem Verfahren von LAATSCH (1979) dansyliert. Anschließend wurde erneut aufgetrennt (Laufmittel I), dansylierte Produkte im UV-Licht sichtbar gemacht und die Verteilung der Radioaktivität durch Autoradiographie bestimmt.

12. Aufnahmeversuche

12.1. Glyphosataufnahme in Bakterien

Die Aufnahmeversuche wurden weitgehend nach einer Vorschrift von PIPERNO und OXENDER (1968) durchgeführt. Dazu wurden Zellen der logarithmischen Wachstumsphase abzentrifugiert (5 Minuten bei 10000 g), mit phosphatfreiem Medium gewaschen und mit dem gleichen Medium auf 15 mg Feuchtgewicht pro ml eingestellt. Die Bakterien-suspension wurde auf Eis gelagert und nicht länger als 1 Stunde für Versuche eingesetzt. Die Aufnahmeexperimente wurden durch Zugabe von 0,2 ml Bakteriensuspension zu 1 ml der getesteten Verbindung in 0,1 M Tris/HCl pH 7,2 gestartet. Nach entsprechenden Inkubationszeiten bei 37 °C wurde 1 ml der Suspension auf einen Membranfilter (2,5 cm Durchmesser, 0,45 µm Porenweite von Millipore) gegeben, sofort abgenutscht und mit 10 ml phosphatfreiem Medium nachgewaschen. Die Filter wurden in Szintillationsgläsern, die mit 10 ml Quickszint 212 (Zinsser) gefüllt waren, gegeben und die Radioaktivität nach 1 Stunde bestimmt.

Für die Bestimmung des K_m -Wertes der Phosphataufnahme von Zellen, die in Glyphosat wuchsen, wurde die Konzentration der Bakteriensuspension auf 0,15 mg Feuchtgewicht pro ml reduziert.

12.2. Glyphosataufnahme in pflanzliche Zellkulturen

Pflanzliche Zellkulturen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden über einen Büchnertrichter abgenutscht und mit 100 ml Tris/Maleat Puffer (50 mM, pH 6,5) nachgewaschen. Etwa 4–5 g Frischgewicht wurden in 10 ml Inkubationsmedium (50 mM Tris/Maleat, pH 6,5) gegeben und der Aufnahmeversuch durch Zugabe von radioaktivem Glyphosat gestartet. Nach den gewünschten Inkubationszeiten (100 Upm bei 30 °C) wurden Proben der Suspension entnommen, über GF/A Glasfaserfilter (Whatman) abgenutscht und mit 5 mal 10 ml H₂O nachgewaschen. Das Zellmaterial (0,8–1,0 g) wurde in gewogene Reagenzgläser gegeben, das Frischgewicht bestimmt und mit 4 ml H₂O eine Stunde bei 90 °C extrahiert. Proben des klaren Überstandes wurden anschließend für die Flüssigszintillationszählung eingesetzt.

13. Mutagenese

Zur Mutagenese mit UV-Strahlung, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin und Ethylmethylsulfonsäure wurden Methoden von CARLTON und BROWN (1981) benutzt.

14. Messung von ¹⁴CO₂

Arthrobacter atrocyaneus wurde in 20 ml Medium (3.5.) mit 50 µM Glyphosat (2 MBq/mMol) angezogen. Die mit Serumstopfen gasdicht verschlossenen Kolben wurden über eine Nadel mit steriler Luft versorgt. Radioaktives CO₂ wurde über eine weitere Nadel in 10 ml Hyamin Hydroxid geleitet und absorbiert. 100 µl Aliquots der Hyamin Hydroxid Lösung wurden für Flüssigszintillationszählung eingesetzt.

15. Hemmung der Proteinbiosynthese in *Arthrobacter* sp. GLP-1 durch Chloramphenicol

Die Hemmung der Proteinbiosynthese durch Chloramphenicol bei Induktion der Glyphosataufnahme in *Arthrobacter* sp. GLP-1 wurde durch den Einbau von radioaktivem Alanin in Zellprotein kontrolliert. Zu zwei 100 ml Kulturen (log. Wachstumsphase, Medium nach 3.1.) wurden 16,7 KBq ^{14}C -Alanin (30 nM) und zu einem Ansatz zusätzlich Chloramphenicol (50 $\mu\text{g/ml}$) hinzugefügt und 5 Stunden weiter kultiviert. Das Protein wurde anschließend nach 4.1. und 7.1. isoliert, quantifiziert (6.) und die Radioaktivität der Proteinlösung durch Flüssigszintillationszählung bestimmt.

16. Radiometrische Methoden

Die Radioaktivität wässriger Lösungen wurde durch Zugabe von 10 ml Quickszint 212 (Zinsser) im Szintillationszähler PW 4550 der Firma Philips bestimmt. Absolute Zerfallsraten wurden mit einem internen ^{14}C -Standard der Firma Amersham/Buchler ermittelt. Die Verteilung von Radioaktivität auf Dünnschichtchromatogrammen wurde mit dem Radiodünnschichtanalysator IM 3000 der Firma Isomess, Straubenhardt, gemessen und mittels eines Apple Computers quantifiziert.

17. Mikroskopie

17.1. Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zur morphologischen Untersuchung der Bakterien wurden mit einem Leitz Orthoplan Mikroskop, welches mit einer Leitz Orthomat Mikroskopkamera ausgerüstet war, gemacht.

17.2. Fixierung und Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Bakteriensuspensionen wurden in 0,1 M Cacodylatpuffer pH 7,2, der 3 % v/v Glutaraldehyd enthielt, für 60 Minuten bei 4 °C präfixiert. Anschließend wurden die Bakterien 3 mal mit Cacodylatpuffer ohne Glutaraldehyd gewaschen und mit 1 % w/v Osmiumtetroxid ebenfalls in Cacodylatpuffer eine Stunde bei Raumtemperatur postfixiert. Das Osmiumtetroxid wurde wie das Glutaraldehyd entfernt und die Proben bei Raumtemperatur durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert. Dazu wurden die Bakterien je 10 Minuten in 25, 50, 70, 80, 90, 100 % Ethanol belassen und abschließend 2 mal je 15 Minuten in 100 % Ethanol, welches durch Molekularsieb (40 nm) wasserfrei war, gegeben. Die Einbettung erfolgte in Spurr's Harz (SPURR, 1969) mit folgenden Ethanol-Kunstharz Mischungen: 1 Stunde 3:1, 2 Stunden 1:1, 3 Stunden 1:3 und über Nacht in reinem Kunstharz. Die Polymerisationstemperatur betrug 65 °C für 24 Stunden.

17.3. Elektronenmikroskopie

Es wurden ca. 90 nm dicke Ultradünnschnitte mit einem Ultramikrotom der Firma Reichert (OmU 2) angefertigt, auf der Wasserfläche des Sammelbehälters mit Chloroform gestreckt und auf unbefilmte Kupfernetzchen aufgenommen. Die Präparate wurden nach REYNOLDS (1963) kontrastiert. Die Ultrastrukturaufnahmen erfolgten an einem Siemens Elektronenmikroskop (Elmiskop 101, bei 80 KV) mit einer Aperturblinde von 50 μm . Das Filmmaterial war ein 6,5 x 9 cm Planfilm Typ Agfaortho 25.

18. Morphologische Untersuchung von *Arthrobacter* sp. GLP-1

Untersuchungen zum Gestaltwechsel von *Arthrobacter* Arten wurden nach einer Vorschrift von CURE und KEDDIE (1973) durchgeführt.

19. Zellwandanalyse bei *Arthrobacter* sp. GLP-1

Die Bestimmung von Diaminosäuren und Zuckern in Zellwänden von *Arthrobacter* sp. GLP-1 erfolgte nach einem Verfahren von BOUSFIELD et al., 1985. Das bei BOUSFIELD et al. benutzte Laufmittel zur Trennung der Aminosäuren wurde durch Laufmittel IV (9.) ersetzt.

III. Zusammenstellung der verwendeten Phosphonoverbindungen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Struktur</u>
Hydroxymethylphosphonsäure	$\text{HOCH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$
Ethylphosphonsäure	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$
Phosphonoameisensäure	$\text{HOOC-PO}_3\text{H}_2$
Phosphonoessigsäure	$\text{HOOC-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$
3-Phosphonopropionsäure	$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$
Aminomethylphosphonsäure	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$
1-Aminoethylphosphonsäure	$\text{H}_3\text{C-CH-PO}_3\text{H}_2$ NH_2
2-Aminoethylphosphonsäure	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$
2-Amino-3-phosphonopropionsäure	$\text{HOOC-CH-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$ NH_2
1-Aminobutylphosphonsäure	$\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-PO}_3\text{H}_2$ NH_2
4-Aminobutylphosphonsäure	$\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_3\text{-CH}_3\text{-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$
2-Amino-4-phosphonobuttersäure	$\text{HOOC-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$ NH_2
Benzolphosphonsäure	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-PO}_3\text{H}_2$
Methandiphosphonsäure	$\text{H}_2\text{O}_3\text{P-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$
Fosfomycin	$\text{H}_3\text{C-CH-CH-PO}_3\text{H}_2$ O
Glyphosat	$\text{HOOC-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2$
Hydroxyethyliden-1.1-diphosphonsäure	$\text{H}_3\text{C-C-(PO}_3\text{H}_2)_2$ OH
N-Methylethylendiamintri(methylenphosphonsäure)	$\text{H}_2\text{O}_3\text{P-CH}_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-(CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2)_2$ CH_3
Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure)	$(\text{H}_2\text{O}_3\text{P-CH}_2)_2\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-(CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2)_2$
Diethylentriaminpenta(methylenphosphonsäure)	$\text{H}_2\text{O}_3\text{P-CH}_2\text{-N-[(CH}_2)_2\text{-N-(CH}_2\text{-PO}_3\text{H}_2)_2]_2$

IV. Ergebnisse

1. Identifizierung eines glyphosatabbauenden Bakteriums als *Arthrobacter Species*

1.1. Herkunft des Stammes

Kulturen von *Klebsiella pneumoniae* wurden auf Minimalmedium mit Glyphosat als einziger Phosphorquelle ausplattiert, um glyphosatabbauende Stämme selektieren zu können. Bei diesen Versuchen wurde ein Stamm entdeckt, der das Herbizid als Phosphorquelle nutzen konnte. Durch Kontrollversuche wurde festgestellt (FORREITER, pers. Mitteilung), daß der isolierte Stamm nicht zu den Enterobacteriaceen gehörte. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Einordnung des Isolats eingeleitet.

1.2. Charakterisierung des Isolats nach grundlegenden physiologischen Eigenschaften

Durch freundliche Unterstützung von Professor Lingens, Hohenheim, sowie durch eigene Untersuchungen konnten folgende Eigenschaften bestimmt werden:

- Gram-positiv bis Gram-labil
- Gram-Färbung Amino-peptidase negativ
- bewegliche Stäbchen mit polarer Begeißelung
- obligat aerob
- Stoffwechsel oxidativ
- keine Sporen bildend
- Katalase positiv
- Cytochrom c Oxidase positiv

1.3. Untersuchungen zum Formwechsel des isolierten Stammes

Nach den unter 1.2. angeführten Merkmalen war sicher, daß der isolierte Stamm zu den coryneformen Bakterien gehörte (JONES und COLLINS, 1986). Eine Untersuchung auf den für die Gattungen *Arthrobacter* und *Brevibacterium* charakteristischen Gestaltwechsel von koccoiden zu stäbchenförmigen Zellen sollte eine genauere Einordnung ermöglichen. In Abb. 2 ist der Wechsel in der Form verschieden alter Kulturen deutlich zu erkennen. Ruhende (links oben) und gealterte Zellen (rechts unten) unterscheiden sich signifikant von stoffwechselaktiven, wachsenden Zellen (links unten und rechts oben). Aufgrund dieses Resultats konnte der isolierte Stamm nur den Gattungen *Arthrobacter* oder *Brevibacterium* zugeordnet werden. Gegen die Einordnung in die Gattung *Brevibacterium* sprach die Beweglichkeit des isolierten Stammes, da Bakterien der Gattung *Brevibacterium* generell unbeweglich sind (JONES und COLLINS, 1986). Um eine sichere Unterscheidung zwischen den beiden Gattungen zu ermöglichen, wurde eine Zellwandanalyse durchgeführt.

1.4. Zellwandanalyse des isolierten Stammes

Nach einer Methode von BOUSFIELD et al. (1985) wurden die Zellwände auf Zucker und Diaminosäuren untersucht. Die Analyse der Zellwandzucker mittels Dünnschicht-chromatographie (Laufmittel V) zeigte das Vorhandensein von Galaktose (ohne Abb.). Das Ergebnis der Aminosäurenbestimmung ist in Abb. 3 dargestellt. Die Zellwandproben

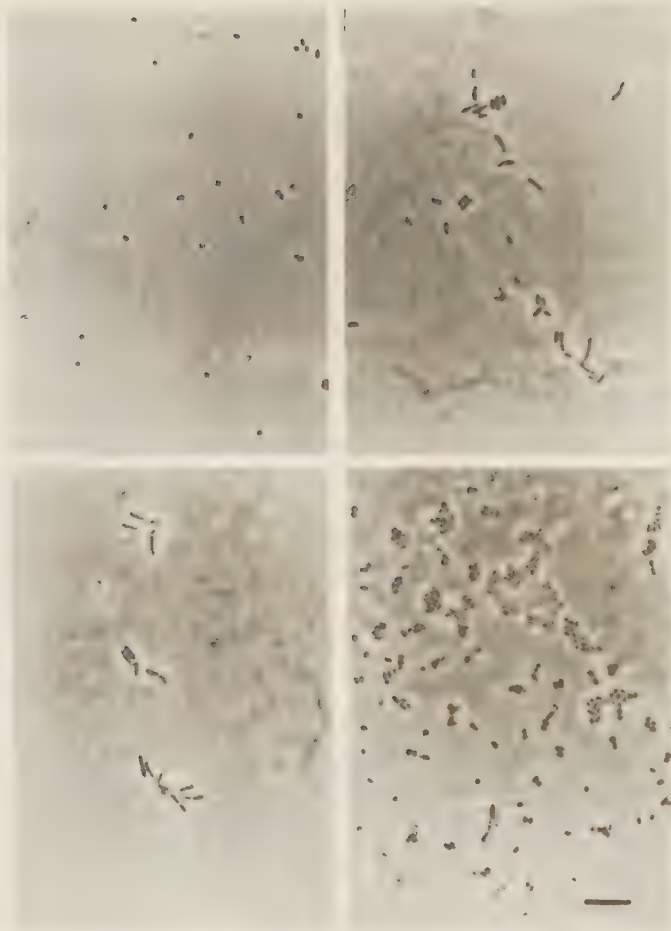


Abb.2. Formwechsel von *Arthrobacter* sp. GLP-1. Die Bakterien wurden auf EGYA-Agarplatten nach einer Vorschrift von CURE und KEDDIE (1973) kultiviert und nach 0 Stunden (links oben), 12 Stunden (links unten), 24 Stunden (rechts oben) und 72 Stunden (rechts unten) fotografiert (II 17.1). Die Länge des Balkens entspricht 5 μ m.

gaben keinen Hinweis auf das Vorhandensein von L-Ornithin und meso- bzw. LL-Diaminopimelinsäure. Im Gegensatz dazu chromatographierte Ninhydrin-positives Material mit dem gleichen R_f -Wert wie L-Lysin. Mit diesem Ergebnis konnte der isolierte Stamm sicher der Gattung *Arthrobacter* (Stammbezeichnung GLP-1) zugeordnet werden, da Zellwände der Gattung *Brevibacterium* Diaminopimelinsäure enthalten.

F -

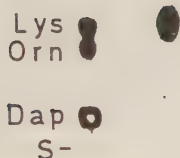


Abb.3. Dünnschichtchromatographische Auftrennung von Aminosäuren aus Zellwänden von *Arthrobacter* sp. GLP-1. Rechte Spur: Probe; linke Spur: meso- und LL-Diaminopimelinsäure, L-Ornithin, L-Lysin. S=Start, F=Front.

1.5. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Arthrobacter* sp. GLP-1

Ultradünnschnitte von Bakterien, die auf Phosphat oder Glyphosat als Phosphorquelle wuchsen, sollten einerseits Erkenntnisse über mögliche Membranstrukturen und Einschlüsse geben, andererseits sollte der Einfluß des Herbizids auf die Morphologie der Zellen untersucht werden. In Abb. 4 sind Dünnschnitte von Bakterien unter den genannten Anzuchtbedingungen dargestellt. Es sind keine Unterschiede in der Gestalt von Zellen, die in 1 mM Glyphosat (oben) oder 1 mM Phosphat (unten) wuchsen, festzustellen. Im Gegensatz dazu gibt es einen Unterschied in der Feinstruktur der Bakterien. Zellen, die mit Phosphat als Phosphorquelle wuchsen, zeigen viele elektronendichte Einschlüsse, die in Bakterien, die mit Glyphosat wuchsen, nicht vorhanden sind. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um Polyphosphatgranula, die den Bakterien als Phosphatspeicher dienen. Für die Charakterisierung der Einschlüsse als Polyphosphate sprechen Ergebnisse aus Wachstumsversuchen. Bakterien, die nach Wachstum mit Phosphat in Medium ohne Phosphorquelle inkubiert wurden, konnten sich noch mehrfach teilen. Wurden die Bakterien dagegen mit Glyphosat angezogen und in Medium ohne Phosphorquelle inkubiert, fanden keine Zellteilungen statt.

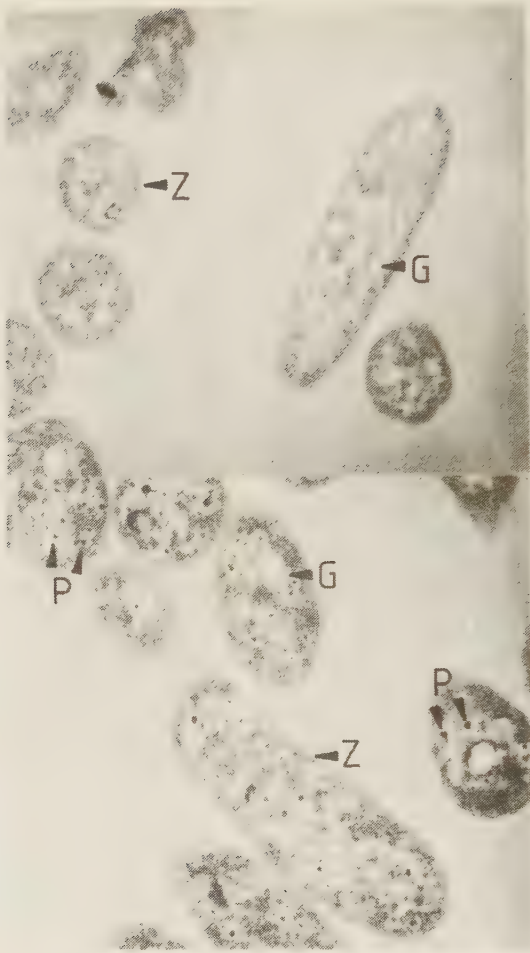


Abb.4. Ultradünnschnitte von *Arthrobacter* sp. GLP-1 nach Wachstum in 1 mM Glyphosat (oben) und 1 mM Phosphat (unten). Zellen, die in Phosphat wuchsen, speichern das Substrat in Form von Polyphosphaten (P), während Zellen, die in Glyphosat wuchsen, nicht dazu fähig sind. Glykogeneinschlüsse (G); Zellwand (Z); Vergrößerung 40000.

2. Einfluß von Glyphosat auf das Wachstum von Bakterien der Gattung *Arthrobacter*

2.1. Wachstumshemmung durch Glyphosat

Nachdem eine Einordnung des glyphosatabbauenden Bakteriums in die Gattung *Arthrobacter* möglich war, wurde der Einfluß des Herbizids auf das Wachstum einer Auswahl von *Arthrobacter* Arten untersucht. Dabei stand ein Vergleich der Wachstumsversuche von *Arthrobacter* sp. GLP-1 (PIPKE, 1984) mit dem Wachstum der anderen Stämme im Vordergrund. In der Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Wachstumsversuche zusammenfassend dargestellt. Es wurden die Generationszeiten und die Exkretion von Shikimisäure und Shikimisäure 3-Phosphat gemessen. Die Meßwerte verdeutlichen die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen. So wird das Wachstum von *A. oxydans* (DSM 420) und *A. paraffineus* (ATCC 21298) nicht durch 5 mM Glyphosat gehemmt, während die Generationszeit bei *A. globiformis* (DSM 20124) und *A. variabilis* (DSM 20132) signifikant zunimmt. Ein ähnlich heterogenes Bild zeigt sich bei der Exkretion von Shikimisäure und S-3-P in das Kulturmedium. Mit der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Glyphosat korrelierte eine unterschiedliche Sensitivität der EPSP-Synthasen gegenüber dem Hemmstoff. Aus den Hemmkurven

Tab.1. Einfluß von Glyphosat auf das Wachstum von *Arthrobacter* Stämmen

Stamm		Generationszeit (h)		Mediumkonzentrationen	
		Kontrolle	5 mM Glyphosat	Shikimisäure	S-3-P (μ M)
<i>A. sp.</i>	DSM 312	6,0	10,0	-	-
<i>A. oxydans</i>	DSM 420	3,7	3,8	-	143
<i>A. histidinolovorans</i>	DSM 20115	2,9	3,8	437	205
<i>A. oxydans</i>	DSM 20120	6,1	23,2	-	105
<i>A. globiformis</i>	DSM 20124	3,4	12,4	19	1774
<i>A. atrocyaneus</i>	DSM 20127	2,7	11,6	-	551
<i>A. variabilis</i>	DSM 20132	3,5	12,0	-	-
<i>A. sp.</i>	DSM 20389	2,1	7,0	-	-
<i>A. paraffineus</i>	ATCC 21298	5,3	5,2	-	-
<i>A. sp.</i>	GLP-1	4,3	4,3	-	-

der EPSP-Synthasen aller *Arthrobacter* Stämme (Abb.5) wird eine Variation von zwei Größenordnungen bezogen auf die I_{50} -Werte (50 % Hemmung des Enzyms im Rohextrakt) ersichtlich. Die EPSP-Synthasen Stämme *A. oxydans* (DSM 20120), *A. sp.* (DSM 20124) und *A. atrocyaneus* (DSM 20127) sind mit einem I_{50} -Wert von etwa 0,1 mM glyphosatsensitiv. Das Enzym aus *A. sp.* GLP-1 ist weitgehend unempfindlich gegen die Wirkung von Glyphosat (I_{50} 11,9 mM), die Übergänge zwischen den extremen I_{50} -Werten sind fließend. Die Bestimmung der Enzymaktivität sollte Aufschluß darüber geben, ob bei

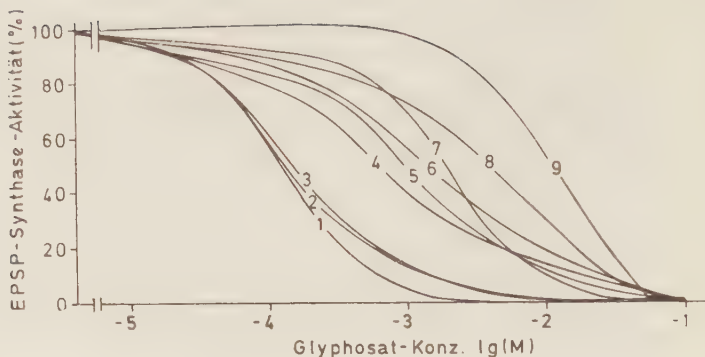


Abb.5. Hemmung der EPSP-Synthase in Rohextrakten verschiedener *Arthrobacter* Stämme. 1. *A. oxydans* (DSM 20120) 2. *A. sp.* (DSM 20124) 3. *A. atrocyaneus* (DSM 20127) 4. *A. histidinolovorans* (DSM 20115) 5. *A. paraffineus* (ATCC 21298) 6. *A. oxydans* (DSM 420) 7. *A. sp.* (DSM 312) 8. *A. variabilis* (DSM 20132) 9. *A. sp.* GLP-1.

einem der Stämme eine Überproduktion der EPSP-Synthase, wie sie zum Beispiel bei AMRHEIN et al. (1983) beschrieben wurde, vorlag. Ein Vergleich der Messungen ist in Tabelle 2 dargestellt und zeigt, daß die Unterschiede zwischen den Stämmen gering sind. Generell läßt sich feststellen, daß Stämme mit einer besonders sensitiven EPSP-Synthase etwas höhere Enzymaktivitäten besitzen als weniger sensitive Stämme.

2.2. Abbau von Glyphosat und anderen Phosphonoverbindungen

Um Stämme zu identifizieren, die Glyphosat als Phosphorquelle nutzen konnten, wurde Minimalmedium mit Glyphosat als einziger Phosphorquelle eingesetzt (3.5.). Von den getesteten *Arthrobacter* Stämmen war nur *Arthrobacter atrocyaneus* (DSM 20127) in der Lage, die C-P Bindung in Glyphosat zu spalten. Bei *A. sp.* GLP-1 und bei *A. atrocyaneus* wurde die Spezifität im Abbau von 20 Organophosphonaten, die als Phosphorquelle dienten, untersucht. Einen Vergleich der beiden Stämme zeigt Tabelle 3. Die stoffwechselphysiologischen Leistungen bezogen auf den Phosphonatabbau

Tab.2. Aktivität der EPSP-Synthase in verschiedenen *Arthrobacter* Stämmen und Hemmung der Aktivität durch Glyphosat (Messungen im Rohextrakt)

Stamm		spez. Aktivität (nkat/mg)	I ₅₀ -Werte (mM)
A. sp.	GLP-1	0,12	11,9
A. variabilis	DSM 20132	0,15	3,9
A. sp.	DSM 312	0,11	1,8
A. oxydans	DSM 420	0,32	1,4
A. paraffineus	ATCC 21298	0,18	1,0
A. histidinovorans	DSM 20115	0,26	0,6
A. atrocyaneus	DSM 20127	0,47	0,2
A. globiformis	DSM 20124	0,71	0,1
A. oxydans	DSM 20120	0,58	0,1

Tab.3. Organophosphonate als Phosphorquelle für *Arthrobacter* sp. GLP-1 und *Arthrobacter atrocyaneus* (DSM 20127)

Phosphorquelle (1 mM)	Generationszeit (h)	
	A. sp. GLP-1	A. atrocyaneus
Orthophosphat	3,2	2,4
Hydroxymethylphosphonsäure	5,1	-
Ethylphosphonsäure	5,0	-
Phosphonoameisensäure	4,8	-
Phosphonoessigsäure	4,4	-
3-Phosphonopropionsäure	4,4	-
Aminomethylphosphonsäure	5,0	11,2
1-Aminoethylphosphonsäure	5,0	-
2-Aminoethylphosphonsäure	5,1	-
2-Amino-3-phosphonopropionsäure	4,7	-
2-Amino-4-phosphonobuttersäure	5,0	-
1-Aminobutylphosphonsäure	5,0	9,4
4-Aminobutylphosphonsäure	4,2	-
Benzolphosphonsäure	4,9	-
Methandiphosphonsäure	14,4	-
Fosfomycin	7,2	-
Glyphosat	4,8	7,8
Hydroxyethyliden-1.1-diphosphonsäure	12,6	-
N-Methylethylendiamintri(methylenphosphonsäure)	9,8	-
Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure)	14,8	-
Diethylentriaminpenta(methylenphosphonsäure)	15,2	-

unterscheiden sich erheblich. Während *A. sp. GLP-1* alle der getesteten Verbindungen als Phosphorquelle nutzte, konnte *A. atrocyaneus* lediglich Glyphosat, Aminomethylphosphonsäure und 1-Aminobutylphosphonsäure zum Wachstum nutzen. Der Abbau von Phosphonaten, die mehr als eine C-P Bindung enthielten, wurde weiter untersucht. Dabei stand die Frage im Vordergrund, wieviele der vorhandenen Phosphonogruppen durch *A. sp. GLP-1* abgespalten werden konnten. Wachstumsversuche mit limitierenden Phosphat- und Phosphonatkonzentrationen zeigten, daß die Zellerträge von *A. sp. GLP-1* bei gleichen Konzentrationen von Orthophosphat und eines Organophosphonates identisch waren (ohne Abb.). Dieses Ergebnis deutete daraufhin, daß unabhängig von der Zahl der vorhandenen Phosphonogruppen in einer Verbindung jeweils nur eine der Gruppen als Phosphorquelle genutzt werden konnte. Weitergehende Untersuchungen von WEIBENFELS (1987) über den Abbau von Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure) (EDTP) durch *Arthrobacter sp. GLP-1* bestätigten die Resultate der Wachstumsversuche. WEIBENFELS konnte mit radioaktiv markiertem EDTP sowie mittels NMR-Spektroskopie zeigen, daß nach Wachstum von *A. sp. GLP-1* in EDTP eine Verbindung mit drei Phosphonogruppen entsteht, die als N-Methylethylendiamintri(methylenphosphonsäure) identifiziert wurde. Ergänzende Versuche zum Abbau von EDTP durch die anderen *Arthrobacter* Stämme zeigten, daß *Arthrobacter variabilis* (DSM 20132) wie *A. sp. GLP-1* eine der vier Phosphonogruppen von EDTP zum Wachstum nutzen konnte.

2.3. Einfluß von Glyphosat auf das Wachstum von *Arthrobacter atrocyaneus*

Die Generationszeit von *A. atrocyaneus* nimmt bei einer Glyphosatkonzentration von 3 mM deutlich zu (Abb. 6). Gleichzeitig scheiden die Bakterien Shikimisäure 3-Phosphat aus (Tab. 1). Im Gegensatz dazu verlängert sich die Generationszeit von *A. sp. GLP-1* erst bei Glyphosatkonzentrationen von 30 mM, wobei weder Shikimisäure noch S-3-P ausgeschieden werden (Pipke, 1984).

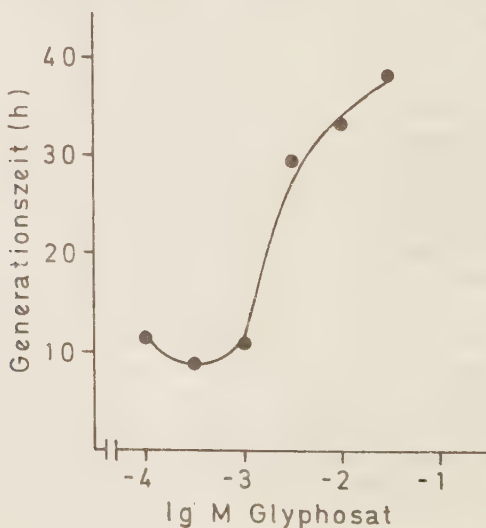


Abb.6. Einfluß von Glyphosat auf die Generationszeit von *Arthrobacter atrocyaneus*

2.4. Vergleich der Zellerträge bei Wachstum mit Phosphat und Glyphosat

Der Zellertrag in der stationären Phase bei zunehmenden Konzentrationen der beiden Phosphorquellen zeigte keinen Unterschied in der Verwertbarkeit von Glyphosat und Phosphat (Abb. 7).

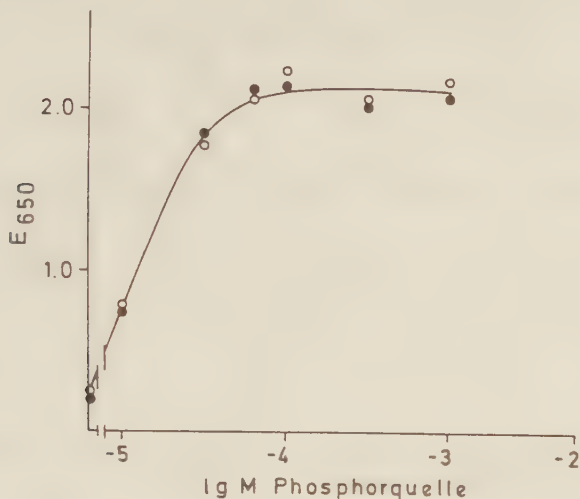


Abb. 7. Zellertrag nach Erreichen der stationären Phase bei Wachstum von *Arthrobacter atrocyaneus* in zunehmenden Glyphosat (●)- und Phosphatkonzentrationen (○).

3. Abbau von Glyphosat durch *Arthrobacter* sp. GLP-1

Umfangreiche Arbeiten zur Inkorporation von $[3^{14}\text{C}]$ Glyphosat in zelluläre Bestandteile der Bakterien sowie Untersuchungen zum Stoffwechsel von N-(Phosphono $[2^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ methyl)-glycin und N-(Phosphono $[3^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}]$ methyl)-glycin mittels ^{13}C -NMR und ^{15}N -NMR Spektroskopie (PIPKE et al., 1987a) gaben Aufschluß über den Abbau des Herbizids und den Stoffwechsel der Bestandteile von Glyphosat. Mit diesen Versuchen konnte jedoch nicht geklärt werden, wie der Abbau von Glyphosat eingeleitet wird. Neben möglichen anderen Zwischenstufen war ein Abbau des Herbizids über Sarcosin (N-Methylglycin) denkbar (Abb. 8). Ergebnisse von Experimenten mit ^{14}C -markierter Aminomethylphosphonsäure (AMPA) zeigten, daß Radioaktivität aus AMPA nicht in die Bakterien inkorporiert wurde (PIPKE et al., 1987a). Diese Befunde standen im Gegensatz zu Experimenten mit N-(Phosphono $[^{14}\text{C}]$ methyl)-glycin, die eine vollständige Aufnahme des Herbizids aus dem Inkubationsmedium und den Einbau von Radioaktivität in Zellkomponenten zeigten (PIPKE, 1984). Daher wurde die Bedeutung von Sarcosin als möglichem Zwischenprodukt des Glyphosatabbaus näher untersucht.

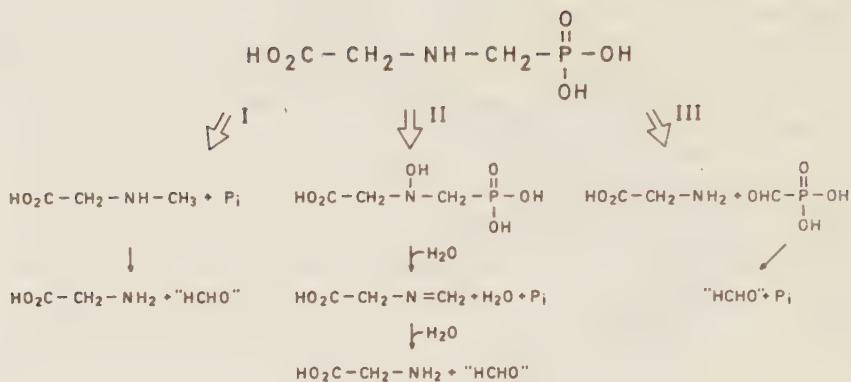


Abb.8. Mögliche Mechanismen der Umwandlung von Glyphosat zu Glycin und einem C₁-Fragment (aus PIPKE et al., 1987a).

3.1. Einfluß von Sarcosin auf den Stoffwechsel von [³¹⁴C] Glyphosat

Der Einfluß von exogenem Sarcosin auf die Aufnahme und den Abbau von radioaktivem Glyphosat zeigte, daß mit zunehmenden Sarcosinkonzentrationen im Inkubationsansatz weniger Radioaktivität von den Bakterien aufgenommen wurde. Die dünnschichtchromatographische Analyse von Zellextrakten (II 7.1.) ergab, daß unter diesen Bedingungen eine zunehmende Menge an Radioaktivität zu einem Ninhydrin-positiven Produkt mit dem gleichen R_f-Wert wie Sarcosin (Laufmittel I und II) verstoffwechselt wurde (Tabelle 4).

Tab.4. Einfluß von exogenem Sarcosin auf die Aufnahme und den Stoffwechsel von Glyphosat in *Arthrobacter* sp. GLP-1.

Konzentration von Sarcosin im Medium (mM)	Restaktivität im Medium (%)	Radioaktivität in Sarcosin (% der Gesamtaktivität in Extrakten)
0	47,0	1,3
10	63,7	3,2
20	72,6	15,5
50	88,3	23,5

3.2. Identifizierung von Sarcosin als Produkt der Glyphosatspaltung

Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie (Tab. 4) deuteten zwar auf Sarcosin als Abbauprodukt von Glyphosat hin, bewiesen die Identität jedoch nicht. Daher wurden radioaktive Flecken mit dem R_f -Wert von Sarcosin von den Dünnschichtplatten eluiert und mit automatischer Aminosäurenanalyse sowie enzymatischem Abbau charakterisiert. In Abb. 9 ist das Ergebnis der Aminosäurenanalyse dargestellt. Die Radioaktivität

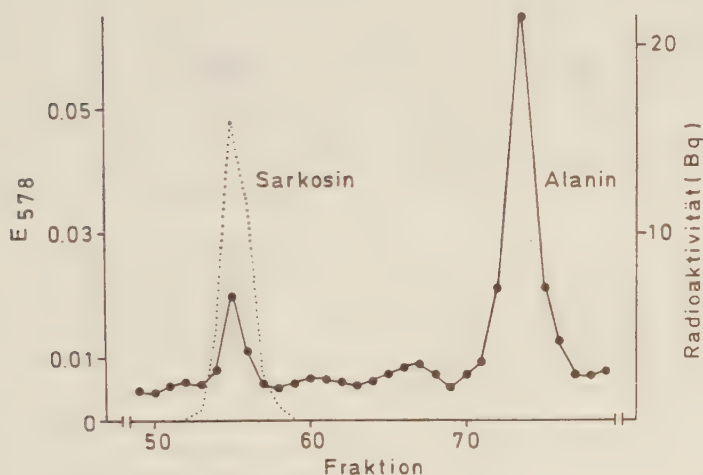


Abb. 9. Aminosäurenanalyse eines radioaktiven Produktes nach Glyphosatspaltung durch *Arthrobacter* sp. GLP-1. Radioaktivität (····), E 578 (●).

des isolierten Produktes koeluiert mit authentischem Sarcosin. Eine zusätzliche Bestätigung wurde durch den enzymatischen Abbau des isolierten Produktes erzielt. Proben des Metabolits wurden mit Sarcosin-Oxidase (Sigma) inkubiert, nach der Enzymbehandlung rechromatographiert und die Verteilung der Radioaktivität durch Autoradiographie bestimmt (Abb. 10). Durch die Inkubation mit Sarcosin-Oxidase wird das Substrat in Glycin und Formaldehyd gespalten, wobei die Radioaktivität von $[3^{14}\text{C}]$ Glyphosat nur in Formaldehyd übergehen kann und verdampft wird. Aus Abb. 10 wird ersichtlich, daß die Radioaktivität von Sarcosin nach Enzymbehandlung verschwunden ist. Die Ergebnisse der Aminosäurenanalyse und des enzymatischen Abbaus belegen hinreichend, daß Sarcosin ein Abbauprodukt von Glyphosat ist.

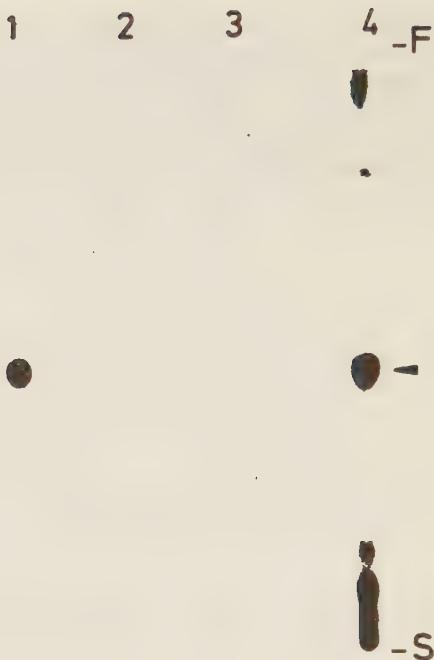


Abb.10. Enzymatischer Abbau von Sarcosin, das als Produkt des Glyphosat-Abbaus von *Arthrobacter* sp. GLP-1 isoliert wurde. Radioaktivität aus einem mit dem R_f -Wert von Sarcosin chromatographierenden Fleck (Pfeil, Spur 4) wurde eluiert, mit hitzeinaktivierter Sarcosin-Oxidase (Spur 1) und mit dem aktiven Enzym (Spur 2 und 3) inkubiert. Radioaktive Produkte wurden über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Verteilung der Radioaktivität durch Autoradiographie sichtbar gemacht. S=Start; F=Front.

4. Untersuchungen zur Spaltung der Kohlenstoff-Phosphor Bindung von Glyphosat

Die Identifizierung von Sarcosin als Produkt der Glyphosatspaltung durch *Arthrobacter* sp. GLP-1 zeigte, daß die erste Reaktion im Abbau von Glyphosat wahrscheinlich die Abspaltung der Phosphonogruppe ist und zu den Produkten Sarcosin und Orthophosphat führt. Aus diesem Grund wurden Versuche zum Nachweis einer Enzymaktivität, welche die C-P Bindung spalten kann, durchgeführt. Ein Enzym, welches eine Kohlenstoff-Phosphor Bindung spaltet, ist bisher nur einmal beschrieben worden (LA NAUZE et al., 1970). Es handelt sich dabei um ein für Phosphonoacetaldehyd spezifisches Enzym, welches aus *Bacillus cereus* isoliert und angereichert wurde. Trotz vielfältiger Bemühungen verschiedener Gruppen gelang es bisher nicht, zellfreie C-P Lyase Aktivität in anderen Organismen nachzuweisen (DAUGHTON et al., 1979; MOORE et al., 1983; WACKETT et al., 1987; SHINABERGER und BRAYMER, 1986; FROST et al., 1987).

4.1. Nachweis einer C-P Lyase Aktivität *in vitro*

Um eine höchstmögliche Empfindlichkeit für den Nachweis einer C-P Lyase zu ermöglichen, wurden die nach verschiedenen Methoden hergestellten Rohextrakte nur mit radioaktiv markiertem Glyphosat inkubiert. Die Auftrennung des Reaktionsansatzes erfolgte durch Dünnschichtchromatographie mit anschließender Quantifizierung von radioaktiven Flecken.

4.1.1. Aufschluß durch Ultraschall

Mit der Herstellung eines Rohextraktes durch den Einsatz von Ultraschall wurde ein gängiges Verfahren zum Zellaufschluß eingesetzt. In Ansätzen mit SH-Reagenzien und Proteaseinhibitoren konnte keine glyphosatspaltende Aktivität nachgewiesen werden. Daher wurde der Aufschlußpuffer vielfältig variiert (II 4.1.), um so günstigere Bedingungen für eine Stabilisierung der C-P Lyase zu ermöglichen. Dies führte ebensowenig zum Erfolg wie eine Dialyse der Rohextrakte, die dazu diente, eventuell vorhandene niedermolekulare Inhibitoren der Reaktion abzutrennen. Da ein Aufschluß durch Ultraschall nicht den Nachweis einer C-P Lyase ermöglichte, wurden weitere Methoden zur Rohextrakterstellung angewendet.

4.1.2. Aufschluß durch Mörsern mit Aluminiumoxid

Die Herstellung von Rohextrakten durch Mörsern mit Aluminiumoxid ist ein zwar aufwendiges aber schonendes Verfahren. Da nach den Ergebnissen mit dem Ultraschallaufschluß offensichtlich war, daß die C-P Lyase Aktivität extrem labil ist, sollte der schonende Aufschluß durch Mörsern den Nachweis einer C-P Lyase ermöglichen. Auch diese Aufschlußmethode wurde vielfältig variiert, ohne daß C-P Lyase Aktivität nachgewiesen werden konnte.

4.1.3. Aufschluß durch Lysozym

Die Herstellung eines Rohextraktes durch Verdauen der bakteriellen Zellwände setzte voraus, daß *Arthrobacter* sp. GLP-1 sensitiv gegen die Wirkung von Lysozym war. Zuerst wurde das Aufschlußverfahren optimiert. Dabei stellte sich heraus, daß ein vollständiger Aufschluß nicht möglich war. Unter optimalen Bedingungen konnten etwa 20 % des vorhandenen Proteins freigesetzt werden. Nach Abtrennung von nicht lysierten Zellen wurde ein Nachweis der C-P Lyase versucht, jedoch ohne Erfolg.

4.2. Nachweis einer C-P Lyase Aktivität *in vivo*

Da die Spaltung der C-P Bindung von Glyphosat im zellfreien System nicht nachgewiesen werden konnte, wurde versucht, eine C-P Lyase Aktivität *in vivo* zu messen. Die Entstehung von radioaktivem Sarcosin aus [^{14}C] Glyphosat sollte bestimmt werden. Dazu war es notwendig, die weitere Verstoffwechselung von Sarcosin zu hemmen. Für die Spaltung von Sarcosin in Glycin und einen C_1 -Körper kamen die Enzyme Sarcosin-Oxidase und Sarcosin-Dehydrogenase in Frage. Beide Enzyme sind durch Acetat und Methoxyacetat hemmbar (BARMAN, 1969). Versuche, die C-P Lyase *in vivo* zu messen (II 5.4.2.), zeigten eine konzentrations- und zeitabhängige Bildung von Sarcosin, das von den Bakterien in das Medium abgegeben wurde. Die Methode sollte durch Permeabilisierung der Bakterien optimiert werden, um eine ungehinderte Diffusion von Sarcosin und damit eine genauere Messung der Aktivität der C-P Lyase zu ermöglichen.

4.3. Messung der C-P Lyase Aktivität in permeabilisierten Zellen

Die Permeabilisierung von *Arthrobacter* sp. GLP-1 mit etablierten Methoden führte zur Inaktivierung der C-P Lyase Aktivität. Obwohl die Ethanol/Toluol Technik nach KORNBERG und REEVES (1972) und die Permeabilisierung durch Cetyltrimethylammoniumbromid nach WHITE et al. (1964) in zahlreichen Versuchen variiert wurden, gelang es in keinem Fall, Sarcosin im Medium von *Arthrobacter* sp. GLP-1 nachzuweisen. Nach zusätzlichen Versuchen zur Messung der C-P Lyase in permeabilisierten Zellen stellte sich heraus, daß bestimmte Konzentrationen von Dimethylsulfoxid (DMSO) die Exkretion von Sarcosin bei *in vivo* Versuchen verdoppelte. Für die Messung der C-P Lyase in permeabilisierten Zellen wurde daher der Inkubationsansatz durch Zugabe von 10 mM Natriumacetat und 2 % DMSO optimiert. Die Ergebnisse der Etablierung eines *in vivo* Testsystems zur Messung der Glyphosatspaltung sind in Abb. 11 zusammengefaßt.

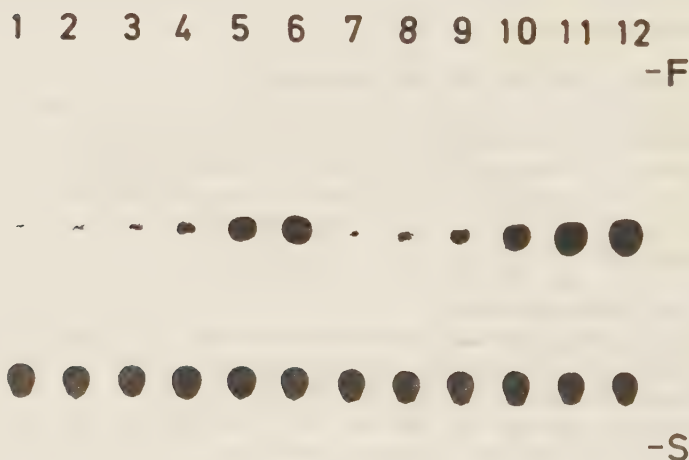


Abb.11. Abbau von Glyphosat durch *In vivo* Messung der C-P Lyase von *Arthrobacter* sp. GLP-1. Bakterien wurden in Gegenwart von radioaktivem Glyphosat inkubiert, Proben des Mediums durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Verteilung der Radioaktivität durch Autoradiographie bestimmt. Spur 1-3: Freisetzung von Sarcosin im Medium nach 20, 40 und 60 Minuten; Spur 4-6: gleicher Versuchsansatz in Gegenwart von 10 mM Natriumacetat; Spur 7-9: wie in Spur 1-3, jedoch in Gegenwart von 2 % DMSO; Spur 10-12: Inkubation in Gegenwart von 2 % DMSO und 10 mM Natriumacetat. S=Start, F=Front. R_f -Werte: Glyphosat 0,15, Sarcosin 0,50.

4.4. Bestimmung eines K_m -Wertes für die C-P Lyase aus *Arthrobacter* sp. GLP-1

Die Etablierung eines Testsystems zur Messung der C-P Lyase aus *A. sp. GLP-1* in permeabilisierten Zellen ermöglichte die Bestimmung eines apparenten K_m -Wertes für die Glyphosatspaltung. Hierzu wurden Kontrollversuche durchgeführt, die belegten, daß die Sarcosinbildung mit der Zellzahl und dem extrahierbaren Protein korrelierten (Abb. 12). Damit war ein Rückschluß von der Sarcosinbildung durch eine bestimmte Zellzahl auf die Sarcosinbildung bezogen auf eine Proteinmenge möglich. Die Zeitabhängigkeit der Sarcosinbildung (Abb. 13) zeigte bis etwa 60 Minuten einen linearen

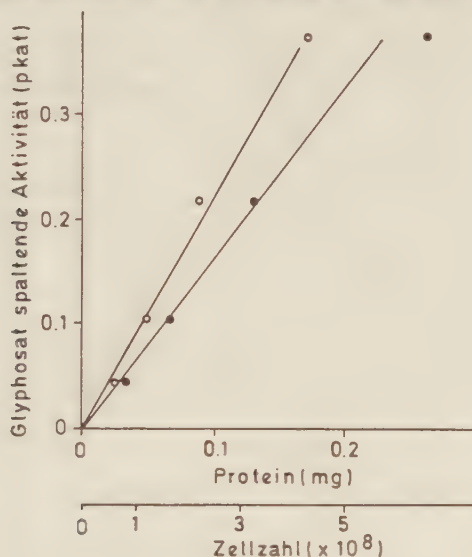


Abb.12. Bildung von Sarcosin in Abhängigkeit von der Zellzahl (O) und vom extrahierbarem Protein (●).

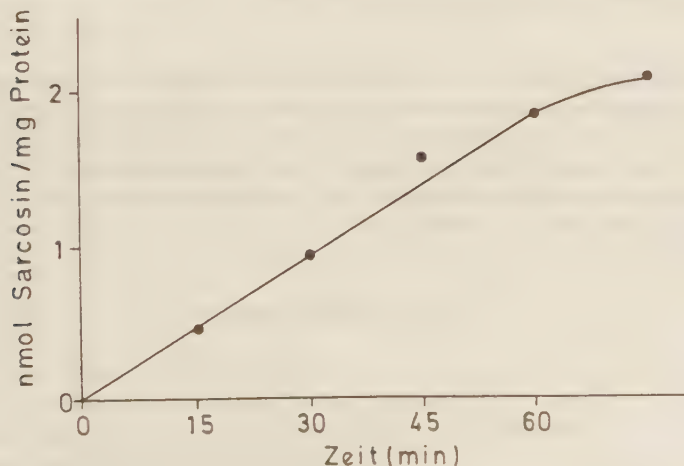


Abb.13. Zeitabhängigkeit der Sarcosinbildung durch *Arthrobacter* sp. GLP-1

Verlauf. Für Routinemessungen wurde daher eine Inkubationszeit von 30 Minuten verwendet. Weitere Vorversuche zeigten, daß die Sarcosinbildung durch das Substrat Glyphosat sättigbar war. Unter diesen Bedingungen konnte der K_m -Wert der Sarcosinbildung aus Glyphosat bestimmt werden (Abb. 14). Der auf diese Weise ermittelte K_m -Wert ist $61 \mu\text{M}$, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $2,2 \text{ pMol/sec} \cdot \text{mg}$.

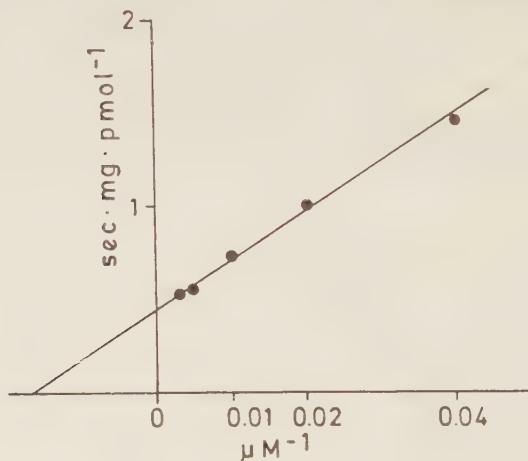


Abb.14. Lineweaver Burk Diagramm der C-P Lyase Reaktion (Sarcosinbildung aus Glyphosat)

5. Glyphosatabbau durch *Arthrobacter atrocyaneus*

Ein Vergleich von *A. atrocyaneus* und *A. sp. GLP-1* hinsichtlich der Glyphosatwirkung auf das Wachstum und die Verwertbarkeit verschiedener Organophosphonate als Phosphorquelle hatte große Unterschiede gezeigt (Tab. 3). Eine Untersuchung des Glyphosatabbaus bei *A. atrocyaneus* sollte Aufschluß darüber geben, ob ein Abbau des Herbizids wie bei *A. sp. GLP-1* über Sarcosin als Zwischenprodukt stattfindet oder ob ein anderer Abbaumechanismus vorliegt.

5.1. Isolierung von Aminomethylphosphonsäure als Abbauprodukt von Glyphosat

Nach Wachstum von *A. atrocyaneus* mit radioaktiv markiertem Glyphosat als Phosphorquelle konnte nach dünnsschichtchromatographischer Auftrennung des Mediums neben Glyphosat ein weiterer radioaktiv markierter Fleck nachgewiesen werden (Abb. 15). Dieser Fleck hatte einen von Sarcosin verschiedenen R_f -Wert. Ein Vergleich mit unterschiedlichen Referenzsubstanzen zeigte, daß der R_f -Wert mit dem von Aminomethylphosphonsäure übereinstimmte. Aminomethylphosphonsäure wurde schon 1977 von RUEPPEL et al. als Abbauprodukt von Glyphosat im Boden nachgewiesen. BALTHAZOR und HALLAS gelang es 1986 ein Flavobacterium zu isolieren, welches Glyphosat in Gegenwart von Phosphat zu Aminomethylphosphonsäure (AMPA) verstoffwechselte. Weitere Versuche sollten bestätigen, daß AMPA Zwischenprodukt beim Glyphosatabbau durch *Arthrobacter atrocyaneus* ist.

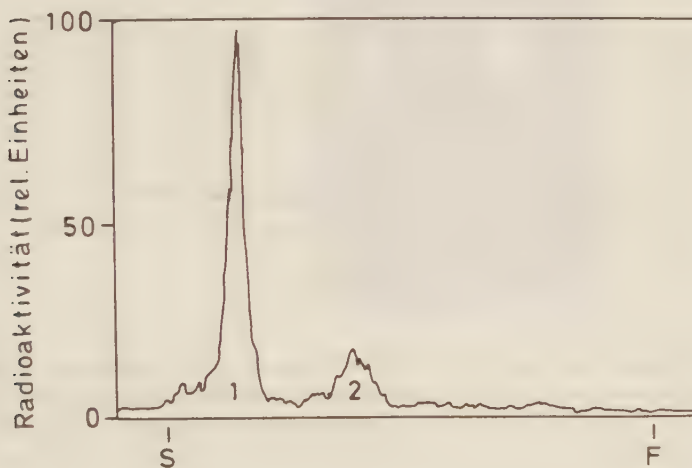


Abb.15. Bildung von Aminomethylphosphonsäure (AMPA) durch *Arthrobacter atrocyaneus*. Die Bakterien wuchsen bis zur stationären Phase in 0,1 mM [^{14}C]-Glyphosat mit einer spez. Aktivität von 40 MBq/mmol. Eine Probe von 20 μl wurde durch Dünnschichtchromatographie (Laufmittel I) aufgetrennt und die Verteilung der Radioaktivität bestimmt. Authentisches Glyphosat und AMPA hatten den gleichen R_f -Wert wie Peak 1 und 2. S=Start, F=Front.

5.2. Identifizierung von Aminomethylphosphonsäure

5.2.1. Dünnschichtchromatographie

Die R_f -Werte der isolierten Verbindung wurden mit R_f -Werten von authentischer Aminomethylphosphonsäure nach Auftrennung in den Laufmitteln I - III verglichen und zeigten keine Unterschiede (ohne Abb.).

5.2.2. Aminosäurenanalyse

Proben des radioaktiven Abbauproduktes von Glyphosat wurden einer automatischen Aminosäurenanalyse unterzogen. Die Radioaktivität der Probe eluierte vollständig mit der gleichen Retentionszeit wie authentische Aminomethylphosphonsäure (Abb. 16).

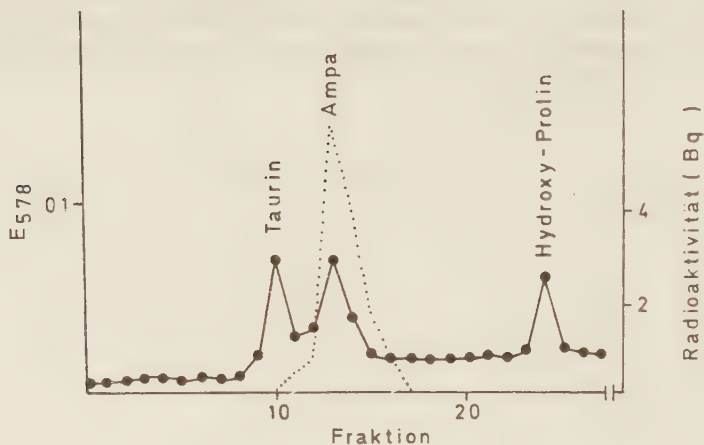


Abb.16. Analyse des Abbauproduktes von Glyphosat durch Aminosäurenanalyse. Die radioaktive Verbindung wurde in Gegenwart von Standards (je 1 nmol) aufgetragen. Es ist nur der Bereich dargestellt, in dem Radioaktivität eluierte. E 578 (O), Radioaktivität (---).

5.2.3. Dansylierung von Aminomethylphosphonsäure

Eine Derivatisierung des Abbauproduktes durch Dansylierung sollte seine Identifizierung als AMPA zusätzlich beweisen. Eine Probe des radioaktiven Metabolits wurde dansyliert, chromatographisch aufgetrennt und die Verteilung der Radioaktivität bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt. Das dansylierte Produkt hat den gleichen R_f -Wert wie authentische dansylierte Aminomethylphosphonsäure. Die Resultate der Dünnschichtchromatographie, Aminosäurenanalyse und Derivatisierung mit Dansylchlorid bestätigen, daß *Arthrobacter atrocyaneus* Glyphosat über AMPA als Zwischenprodukt abbaut und damit einen anderen Stoffwechselweg realisiert als *Arthrobacter* sp. GLP-1, bei dem Sarcosin als Produkt der Glyphosatspaltung entsteht.

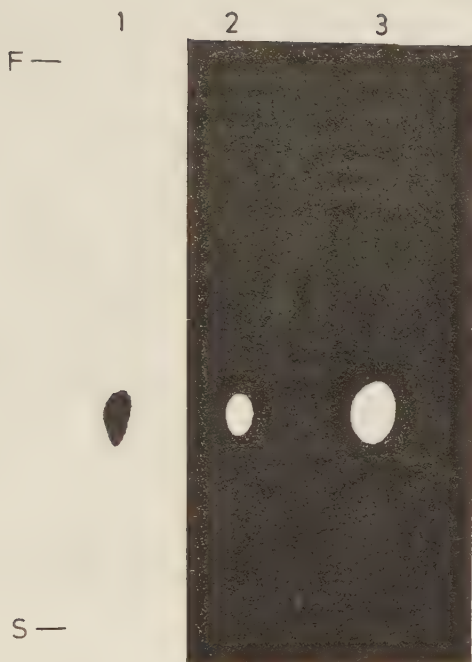


Abb.17. Vergleich des dansylierten Abbauproduktes von Glyphosat mit dansylierter Aminomethylphosphonsäure nach Dünnschichtchromatographie in Laufmittel 1. Spur 1: Autoradiographie des dansylierten Abbauproduktes; Spur 2 und 3: Aufnahme desselben Chromatogramms im UV-Licht. (Spur 2: dansyliertes Produkt; Spur 3: dansyliertes AMPA). S=Start, F=Front.

5.3. Glyphosatabbau in Gegenwart von Orthophosphat

Das Wachstum von *A. atrocyaneus* mit Orthophosphat und Glyphosat als Phosphorquellen sollte Aufschluß über die Regulation der AMPA-Bildung aus Glyphosat geben. Aus Abb. 18 wird ersichtlich, daß Aminomethylphosphonsäure erst dann gebildet wird, wenn Orthophosphat aus dem Medium verschwunden ist. Die Spaltung von Glyphosat in einen C_2 -Körper und AMPA wird somit durch Phosphat gehemmt. Die Regulation des Glyphosatabbaus in *A. sp.* GLP-1 ist ähnlich. Das Herbizid wird erst dann von den Bakterien aufgenommen und metabolisiert, wenn Phosphat nicht mehr im Medium nachweisbar ist (PIPKE et al., 1987b).

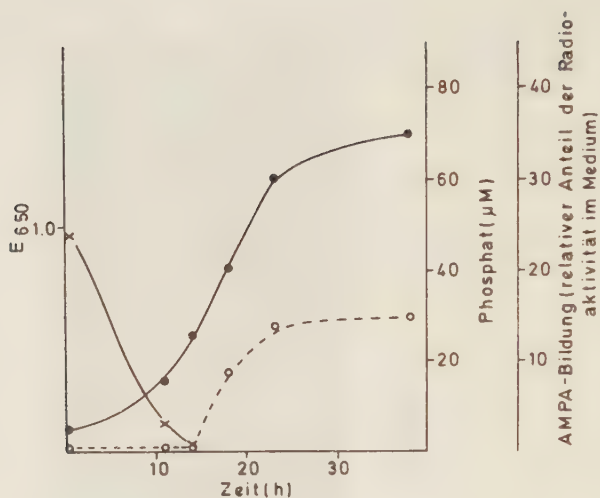


Abb.18 . Bildung von Aminomethylphosphonsäure bei Wachstum mit Orthophosphat und Glyphosat als Phosphorquellen. Wachstum (●); Phosphatkonzentration im Medium (×); Bildung von AMPA (○).

5.4. Verstoffwechselung von Aminomethylphosphonsäure

Mit der Spaltung von Glyphosat in AMPA durch *A. atrocyaneus* war der Abbau des Herbizids keineswegs abgeschlossen, da die zur Deckung des Phosphorbedarfs notwendige Spaltung der C-P Bindung noch nicht erfolgt war. Durch Fütterungsversuche mit [^{14}C]Glyphosat wurde der weitere Stoffwechsel von AMPA untersucht. Messungen zur Freisetzung von Radioaktivität in Form von CO_2 belegten die Mineralisierung von AMPA (Abb. 19). Im Gegensatz zu Beobachtungen bei *Pseudomonas* sp. PG 2982 und *A. sp.* GLP-1, die den Einbau von Radioaktivität aus Glyphosat in Zellbestandteile bewiesen (SHINABERGER und BRAYMER, 1986; PIPKE, 1984), ist bei *A. atrocyaneus* keine Inkorporation von Radioaktivität in die Bakterien feststellbar. Der Metabolismus von Glyphosat bei *A. atrocyaneus* ähnelt damit dem eines *Flavobacterium* (BALTHAZOR und HALLAS, 1986), obwohl es zwischen beiden Organismen Unterschiede in der Regulation des Glyphosatstoffwechsels gibt. Das von BALTHAZOR und HALLAS beschriebene Bakterium baut Glyphosat in Gegenwart von Phosphat zu AMPA ab. Die Mineralisierung von AMPA wird jedoch auch bei der *Flavobacterium* Species durch Orthophosphat gehemmt.

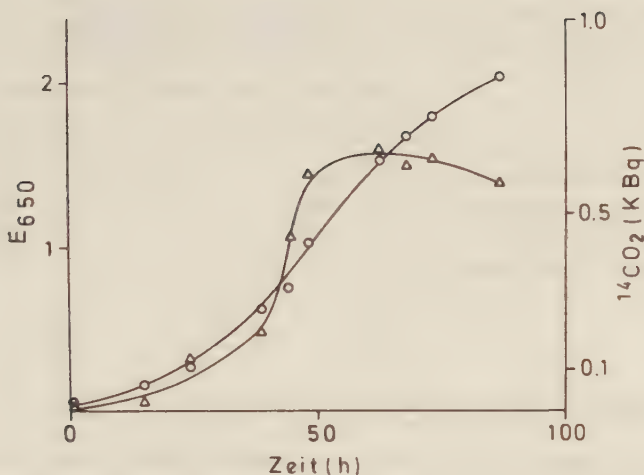


Abb.19. Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ aus Phosphono- ^{14}C methylglycine. Wachstum (O); CO_2 -Bildung (Δ)

6. Einfluß von Glyphosat auf die Regulation der Sarcosin-Oxidase

Die Bildung von Sarcosin als Abbauprodukt im Glyphosatstoffwechsel war Anlaß für die Untersuchung des Enzyms Sarcosin-Oxidase. Dieses Enzym spaltet Sarcosin in Glycin und ein C_1 -Fragment. Das C_1 -Fragment wird über Tetrahydrofolat abhängige Reaktionen weiter verstoffwechselt (PIPKE et al., 1987a). Der Einfluß der Phosphorquellen (Phosphat und Glyphosat) und der Stickstoffquellen (NH_4Cl und Sarcosin) auf die Aktivität der Sarcosin-Oxidase aus *A. sp.* GLP-1 und *A. atrocyaneus* wurde untersucht. Zuerst konnte bei beiden Organismen nachgewiesen werden, daß es sich bei dem Enzym tatsächlich um eine Oxidase handelt, da nach 24 Stunden Dialyse der Rohextrakte kein Kofaktorbedarf festgestellt wurde. Die Ergebnisse der Messungen des Enzyms unter verschiedenen Anzuchtbedingungen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Dabei wird deutlich, daß die Aktivität der Sarcosin-Oxidase in *A. sp.* GLP-1 von der Phosphorquelle abhängt. Mit 1 mM Glyphosat ist die Aktivität der Sarcosin-Oxidase etwa 2,8 mal höher als mit 1 mM Phosphat als Phosphorquelle. Bei *A. atrocyaneus* ist kein Einfluß feststellbar. Das Ergebnis stimmt mit der Analyse des Glyphosatstoffwechsels überein, da nur bei *A. sp.* GLP-1 Sarcosin als Intermediat auftritt. Die größte Aktivität der Sarcosin-Oxidase ist in Zellen vorhanden, die mit Sarcosin als einziger Stickstoffquelle wuchsen.

Tab. 5. Einfluß von Stickstoff- und Phosphorquellen auf die Aktivität der Sarcosin-Oxidase aus *Arthrobacter* sp. GLP-1 und *Arthrobacter atrocyaneus*

Anzuchtbedingungen	Sarcosin-Oxidase Aktivität in pkat/mg Protein	
	A. sp. GLP-1	A. atrocyaneus
10 mM NH ₄ Cl ; 1 mM Phosphat	14,5	46,0
10 mM NH ₄ Cl ; 1 mM Glyphosat	40,5	44,7
10 mM Sarcosin ; 1 mM Phosphat	243,3	1540
10 mM Sarcosin ; 1 mM Glyphosat	231,9	1473

7. Untersuchungen zur Glyphosataufnahme bei *Arthrobacter* sp. GLP-1

Der Glyphosattransport bei *A. sp. GLP-1* ist ein aktiver Prozeß, der wesentlich von der Phosphorquelle und den Anzuchtbedingungen abhängt. Orthophosphat hemmt den Glyphosattransport und reprimiert das Aufnahmesystem (PIPKE, 1984). Die Aufnahme von Glyphosat (K_m 125 μ M) wird durch Phosphat (K_i 24 μ M) und AMPA (K_i 50 μ M) kompetitiv gehemmt (PIPKE, 1984). Neben Phosphat und AMPA hemmen weitere Phosphonverbindungen, Arsenat und Phosphatester die Glyphosataufnahme wohingegen Strukturanaloga ohne Phosphor keinen Einfluß haben. Zusätzliche Versuche sollten den Transport des Herbizids weiter charakterisieren.

7.1. Induktion der Glyphosataufnahme

Wie oben schon erwähnt reprimiert Orthophosphat das Aufnahmesystem für Glyphosat. Der Einfluß anderer Phosphorquellen auf den Glyphosattransport und die Induktion der Glyphosataufnahme nach Entzug der verschiedenen Phosphorquellen wurde untersucht. Es wurden Glyphosat, Orthophosphat, AMPA und Glucose 6-Phosphat als Phosphorquelle angeboten und die Änderung in der Aufnahmeaktivität für Glyphosat bestimmt (Abb. 20). Bei allen Verbindungen führt der Entzug der Phosphorquelle zu einer drastischen Steigerung der Aufnahmeaktivität für Glyphosat. Dabei ist zu beachten, daß in Gegenwart von Orthophosphat und Glucose 6-Phosphat kein Glyphosattransport nachweisbar ist. Auch bei Bakterien, die mit Glyphosat oder AMPA als Phosphorquelle wuchsen, ist eine deutliche Aktivierung des Aufnahmesystems durch Inkubation in Medium ohne Phosphorquelle zu beobachten.

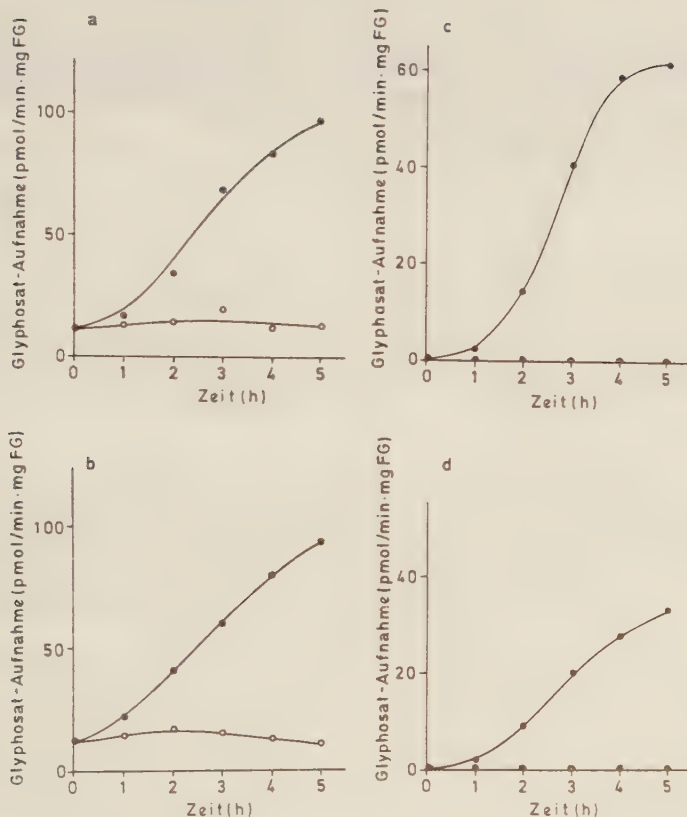


Abb.20 . Induktion der Glyphosataufnahme durch Inkubation in Medien ohne Phosphorquelle. Phosphorquellen (1mM): (a) Glyphosat; (b) AMPA; (c) Orthophosphat; (d) Glucose 6-Phosphat. Die geschlossenen Symbole zeigen die Aufnahmeaktivität nach Entzug der Phosphorquellen, die offenen Symbole beschreiben die Aufnahmeaktivität in Anwesenheit der Phosphorquellen (1 mM).

7.2. Rolle der Proteinbiosynthese bei der Induktion des Aufnahmesystems

Es wurde untersucht, inwieweit Proteinbiosynthese an der Steigerung der Aufnahmeaktivität für Glyphosat nach Inkubation ohne Phosphorquelle beteiligt ist. Die Proteinbiosynthese wurde durch Chloramphenicol gehemmt und die Wirkung des Antibiotikums durch den Einbau von ^{14}C -Alanin in zelluläres Protein überprüft. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden betrug die eingebaute Radioaktivität in Ansätzen mit Chloramphenicol 15,8 % der Radioaktivität der Kontrolle. Damit war gezeigt, daß die benutzte Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ ausreichte, um die Proteinbiosynthese weitgehend zu hemmen. Wie aus Abb. 21 ersichtlich ist, findet in Gegenwart von Chloramphenicol keine Induktion des Aufnahmesystems für Glyphosat statt.

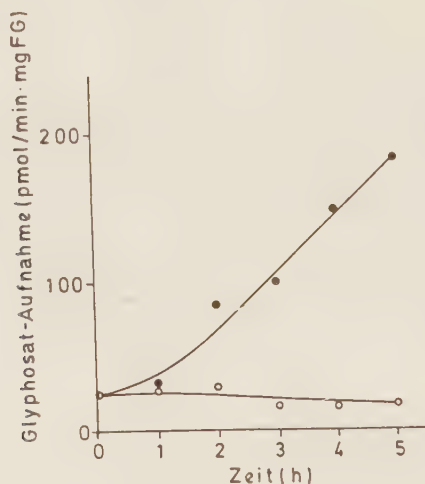


Abb. 21 . Einfluß von Proteinbiosynthese auf die Induktion der Glyphosataufnahme durch Inkubation in Medium ohne Phosphorquelle. Die Bakterien wuchsen mit 1 mM Glyphosat und wurden zu Versuchsbeginn in Medium ohne Phosphorquelle überführt. Offene Symbole: Inkubation in Gegenwart von Chloramphenicol (50 $\mu\text{g/ml}$); geschlossene Symbole: Inkubation ohne Antibiotikum.

7.3. Einfluß von Glyphosat auf die Regulation der alkalischen Phosphatase

Von anderen Bakterien ist bekannt, daß Phosphatverarmung zu einer Aktivierung der alkalischen Phosphatase führt (HORIUCHI et al., 1959; TORRIANI, 1960). Die Aktivität der alkalischen Phosphatase aus *Arthrobacter* sp. GLP-1 wurde nach Wachstum mit Phosphat und Glyphosat als Phosphorquelle bestimmt. Aus Tabelle 6 geht hervor, daß Bakterien, die in Gegenwart von Phosphat wuchsen, eine geringe Phosphatase-Aktivität

besaßen. Bakterien, die ohne Phosphorquelle inkubiert wurden, und Bakterien, die mit Glyphosat als Phosphorquelle wuchsen, haben eine deutlich gesteigerte Aktivität der alkalischen Phosphatase. Die Ergebnisse in Tabelle 6 zeigen außerdem, daß Glyphosat keinen Einfluß auf die Regulation der Phosphatase hat.

Tab. 6 Aktivität der alkalischen Phosphatase in *Arthrobacter* sp. GLP-1 in Abhängigkeit von der Phosphorquelle

Phosphorquelle (1 mM)	spezifische Aktivität (nkat/mg Protein)
Orthophosphat	0,44
Glyphosat	29,1
Glyphosat *	35,4
ohne Phosphorquelle *	31,4

* die Bakterien wuchsen in 1 mM Glyphosat als Phosphorquelle und wurden 4,5 Stunden mit Glyphosat bzw. ohne Phosphorquelle weiterinkubiert, bevor die Aktivität der alkalischen Phosphatase bestimmt wurde.

7.4. Glyphosataufnahme bei *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae*

Die Aufnahme des Herbizids durch Bakterien, die Glyphosat nicht als Phosphorquelle nutzen konnten, war nur nach Inkubation in Medium ohne Phosphorquelle meßbar. Die Aufnahmeraten von *E. coli* ATCC 9637, *K. pneumoniae* wt und *A. sp.* GLP-1, die bei Phosphatmangel gemessen wurden, unterschieden sich nicht (Abb. 22).

7.5. Glyphosataufnahme bei *Arthrobacter* sp. GLP-1 in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Aufnahme des Herbizids durch *Arthrobacter* sp. GLP-1 ist pH abhängig (Abb. 23) Das Optimum der Glyphosataufnahme liegt zwischen pH 6,0–7,0. Das pH-Optimum weist auf einen Transport des Glyphosatmoleküls als Dianion $[\text{O}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{PO}_3^{2-}]$ hin (WAUCHOPE, 1976).

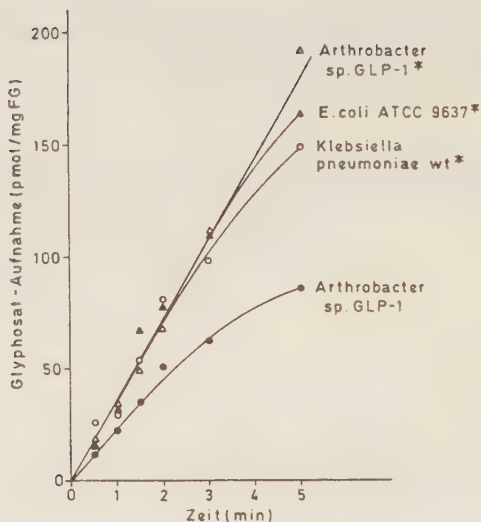


Abb.22. Glyphosattransport bei *Arthrobacter* sp. GLP-1 nach Wachstum mit 1 mM Glyphosat als Phosphorquelle (●). * Die Aufnahme des Herbizids durch *E. coli* ATCC 9637 (▲), *K. pneumoniae* wt (○) und *A. sp. GLP-1* (Δ) wurde nach 4 Stunden Inkubation ohne Phosphorquelle gemessen.

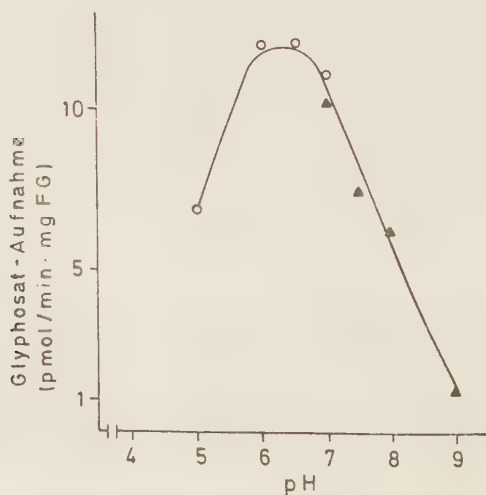


Abb.23. Glyphosataufnahme durch *Arthrobacter* sp. GLP-1 in Abhängigkeit vom pH-Wert. (Kreise: Tris/Maleat Puffer; Dreiecke: Tris/HCl Puffer)

7.6. Einfluß von divalenten Metallionen auf den Glyphosattransport

Die Messung der Glyphosataufnahme in Gegenwart von divalenten Metallionen sollte zeigen, ob ein Zusammenhang zwischen Stabilitätskonstanten der Metall-Glyphosat Komplexe und der Aufnahme rate besteht. Die Ergebnisse in Tabelle 7 zeigen, daß Ni^{2+} die Aufnahme rate mehr als verdoppelt. Ca^{2+} und Mn^{2+} bewirken eine geringere Steigerung der Aufnahme rate, während Zn^{2+} den Glyphosattransport deutlich hemmt. Ein Zusammenhang zwischen der Stabilität der Metall-Glyphosat Komplexe und der Aufnahme rate kann nicht hergestellt werden (MOTOKAITIS und MARTELL, 1985).

Tab. 7 . Einfluß von divalenten Metallionen auf den Glyphosattransport bei *A. sp.* GLP-1

Metallion (1 mM)	Aufnahme rate (% der Kontrolle)	Stabilitätskonstanten der Metall-Glyphosat Komplexe **
ohne Metallion	100 *	-
Ca^{2+}	141	3,25
Co^{2+}	83	7,23
Cu^{2+}	104	11,93
Mn^{2+}	168	5,47
Ni^{2+}	225	8,10
Zn^{2+}	40	8,74

* 100 % = 12,1 pmol Glyphosat /min-mg FG; Glyphosatkonzentration 50 μM .

** die Werte geben den Logarithmus des Quotienten aus Metallkonzentration zur Konzentration der Metall-Glyphosat Komplexe wieder

7.7. Nachweis von Glyphosat in Zellen von *Arthrobacter sp.* GLP-1

Zur weiteren Charakterisierung des Glyphosattransports wurde untersucht, ob das Herbizid in die Zellen gelangt oder ob Glyphosat schon beim Transport in Sarcosin und Orthophosphat gespalten wird. Dazu wurden Bakterien kurzzeitig mit radioaktiv markiertem Glyphosat inkubiert. Den Zellen anhaftendes radioaktives Glyphosat wurde dann durch einen vielfachen Überschuß von nicht markiertem Glyphosat verdrängt. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen, die Extrakte mittels Dünnschicht-chromatographie aufgetrennt und die Verteilung der Radioaktivität durch Autoradiographie bestimmt. Aus Abb. 24 geht hervor, daß der größte Teil der Radioaktivität aus dem Extrakt mit authentischem radioaktiven Glyphosat cochromatographiert. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß Glyphosattransport und Glyphosatabbau zwei voneinander zu trennende Prozesse sind.



Abb.24. Nachweis von Glyphosat in Zellen von *Arthrobacter* sp. GLP-1. Linke Spur: Autoradiographie eines Extraktes von Bakterien, die kurzzeitig mit radioaktivem Glyphosat inkubiert wurden. Rechte Spur: radioaktives Glyphosat (R_f -Wert 0,13) und radioaktives Sarcosin (R_f -Wert 0,48) als Referenzen. Die Hauptaktivität im Extrakt hat den gleichen R_f -Wert wie Glyphosat. S=Start, F=Front.

7.8. Vergleichende Untersuchungen zur Regulation von Glyphosataufnahme und Glyphosatabbau

Die Ergebnisse zum Nachweis von Glyphosat in den Zellen von *A. sp.* GLP-1 deuteten auf eine Trennung von Glyphosattransport und Glyphosatspaltung hin. Versuche zur Induktion des Glyphosattransports bei gleichzeitiger Messung des Glyphosatabbaus an permeabilisierten Zellen sollten Aufschlüsse darüber geben, ob beide Vorgänge gleich oder unterschiedlich reguliert werden. In Abb. 25 ist die Induktion der Glyphosataufnahme durch Inkubation in Medium ohne Phosphorquelle dargestellt. Die Aufnahmeaktivität für Glyphosat nimmt kontinuierlich zu und ist nach 4 Stunden etwa 8 mal größer als zu Versuchsbeginn. Im Gegensatz dazu ändert sich die Aktivität der C-P Lyase nicht wesentlich. Nach 4 Stunden ist sie 1,5 mal höher als zu Versuchsbeginn. Es ist offensichtlich, daß der Glyphosattransport und die Aktivität der C-P Lyase getrennt reguliert werden. Ein ähnlicher Versuch mit Bakterien, die nach Wachstum auf Phosphat Glyphosat weder transportieren noch spalten konnten, sollte Aufschluß über den zeitlichen Verlauf der Induktion beider Prozesse geben. Aus Abb. 26 geht hervor, daß nach 1 Stunde Inkubation ohne Phosphorquelle die Glyphosataufnahme, nicht jedoch der Abbau des Herbizids nachweisbar ist. Man erkennt eine deutliche Verzögerung zwischen

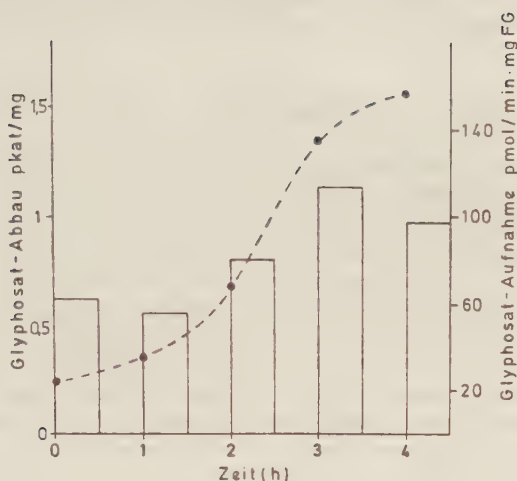


Abb.25. Induktion von Glyphosataufnahme und Glyphosatabbau nach Wachstum in 1 mM Glyphosat und anschließender Inkubation ohne Phosphorquelle. Glyphosataufnahme (●); Glyphosatabbau (—).

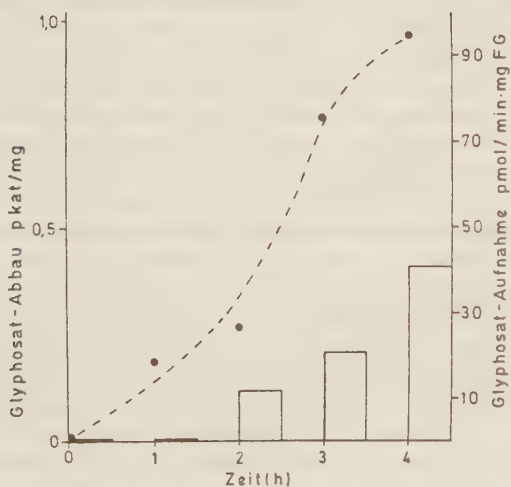


Abb.26. Induktion von Glyphosataufnahme und Glyphosatabbau nach Wachstum in 1 mM Phosphat und anschließender Inkubation ohne Phosphorquelle. Glyphosataufnahme (●); Glyphosatabbau (—).

der Induktion der Glyphosataufnahme und der Induktion der C-P Lyase. Auch dieses Ergebnis belegt die Trennung von Glyphosattransport und Glyphosatabbau in zwei unabhängige Vorgänge.

8. Die Nutzung von Glyphosat als Stickstoffquelle

Die Experimente zum Abbau von Glyphosat durch *Arthrobacter* sp. GLP-1 zeigten, daß der erste Schritt die Abspaltung der Phosphonogruppe von Glyphosat war, wobei Sarcosin und Orthophosphat entstanden. Sarcosin kann von *A. sp. GLP-1* als Stickstoffquelle genutzt werden. Im Gegensatz dazu konnte Glyphosat nicht als Stickstoffquelle verwendet werden. Ein Vergleich von Stickstoff- und Phosphorkonzentrationen, die zum Erreichen einer maximalen optischen Dichte nötig sind, zeigte, daß die Stickstoffkonzentration (NH_4^+) zwei Größenordnungen (10 mM) höher sein mußte, als die Phosphorkonzentration (0,1 mM; P_i). Daraus folgte, daß die Nutzung von Glyphosat als Stickstoffquelle an die Freisetzung erheblicher Mengen von Orthophosphat gebunden war. Wie schon erwähnt (7.), hemmt Phosphat die Glyphosataufnahme (K_m Glyphosat 125 μM , K_i Phosphat 24 μM). Glyphosat konnte vermutlich deshalb nicht als Stickstoffquelle genutzt werden, weil freigesetztes Phosphat den Transport des Herbizids und damit den Abbau zu Sarcosin inhibierte. Die Mutagenese des Glyphosataufnahmesystems sollte daher zur Stickstoffverwertung führen.

8.1. Mutagenese von *Arthrobacter* sp. GLP-1

Das Ziel der Mutagenese war die Erzeugung eines Stamms, der Glyphosat als Stickstoffquelle nutzen konnte. Zur Mutagenese von *Arthrobacter* sp. GLP-1 wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Als Mutagene dienten UV-Strahlung und die alkylierenden Verbindungen Ethylmethylsulfonsäure und N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin. Zur Selektion wurden Agarplatten mit 10 mM Glyphosat als Stickstoff- und Phosphorquelle verwendet. Schon bei den ersten Versuchen zeigte sich, daß häufig eine Mutation zur Nutzung von Tris als Stickstoffquelle auftrat. Daher wurde der Tris-Puffer durch einen stickstofffreien Maleinsäure-Puffer ersetzt. Trotz dieser Verbesserung wurden viele Kolonien entdeckt, die zwar langsam auf den Platten, jedoch nie in Flüssigmedium wuchsen. Wie sich herausstellte, enthielt der verwendete Bacto-Agar (Difco) zu viele Verunreinigungen, die ein geringes Wachstum ermöglichten. Für die weiteren Versuche wurde daher Sea Plaque Agarose (FMC) zur Verfestigung der Medien verwendet. Die Mutagenesebedingungen wurden durch die Bestimmung von Dosis-Effekt Kurven optimiert. Obwohl mit verschiedenen Mutationsraten gearbeitet wurde, waren die Versuche mit UV-Strahlung und Ethylmethylsulfonsäure erfolglos. Nach mehrfach wiederholten Experimenten mit Nitrosoguanidin konnten zwei Kolonien isoliert werden, die sehr langsam auf den Platten wuchsen. Beide Kolonien waren weißlich und hatten nach 4 wöchiger Inkubation bei 30 °C einen Durchmesser von 2 bzw. 4 mm Durchmesser. Zuvor wurden ca. 50 Kolonien isoliert, die nahezu klar waren und flach wuchsen. Bei weiterer Inkubation stellte sich heraus, daß diese Klone nur die Agarose lysieren konnten. Ein Wachstum in Flüssigmedium wurde bei keinem der Klone beobachtet. Für die weiteren Versuche wurden die beiden weißlichen Klone weiter auf Platten und in Flüssigmedium kultiviert. Dabei zeigte sich, daß beide Klone in Flüssigmedium wachsen konnten. Die Klone wuchsen sehr langsam

in Flüssigmedium, wobei der Klon mit dem ursprünglich größerem Koloniedurchmesser etwas schneller war und daher für die weiteren Versuche eingesetzt wurde. Die Klone wurden als *A. sp. GLP-1/Nit-1* und *A. sp. GLP-1/Nit-2* bezeichnet.

8.2. Wachstum von *Arthrobacter sp. GLP-1/Nit-1*

Zur Anzucht der Mutante wurde das Medium nach II 3.2. verwendet. Es enthielt einen Maleinsäure/NaOH Puffer und 10 mM Glyphosat als Stickstoff- und Phosphorquelle. Der Abbau von Glyphosat wurde anhand der Abnahme von Radioaktivität im Medium und anhand der Freisetzung von Orthophosphat verfolgt. Das Wachstum der Mutante auf Glyphosat war verglichen mit dem Wachstum auf Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle deutlich verlangsamt. So dauerte die lag-Phase ca. 4 Tage und das Erreichen der stationären Phase etwa 8-10 Tage. Abb. 27 zeigt eine sehr gute Korrelation von Glyphosatverbrauch, Phosphatfreisetzung und Wachstum. Die Nutzung des Herbizids als Stickstoffquelle ist offensichtlich.

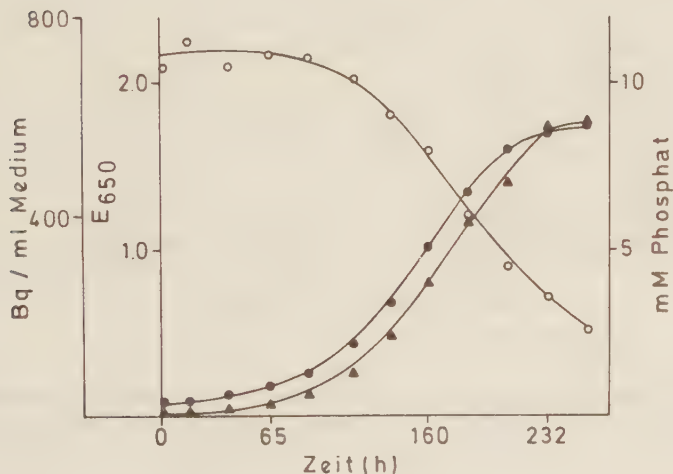


Abb.27. Wachstum von *Arthrobacter sp. GLP-1/Nit-1*, einer Mutante von *A. sp. GLP-1*, die das Herbizid Glyphosat als Stickstoffquelle nutzen kann. Im Medium war Glyphosat die einzige Verbindung, die Stickstoff und Phosphor enthielt. Die Glyphosatkonzentration war 10 mM mit einer spez. Aktivität von 8 KBq/mMol. Radioaktivität im Medium (○); Wachstum (●); Phosphatgehalt im Medium (▲).

8.3. Zellerträge bei Wachstum mit Glyphosat und Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle

Wachstumsversuche mit unterschiedlichen Glyphosat- und Ammoniumchloridkonzentrationen sollten zeigen, ob beide Stickstoffquellen vergleichbare Zellerträge ermöglichten. Aus Abb. 28 geht hervor, daß keine Unterschiede im Hinblick auf die erzielten Zellerträge feststellbar sind. Außerdem wird deutlich, daß eine Steigerung der Zellerträge durch Erhöhung der Stickstoffkonzentration über 10 mM nicht möglich ist.

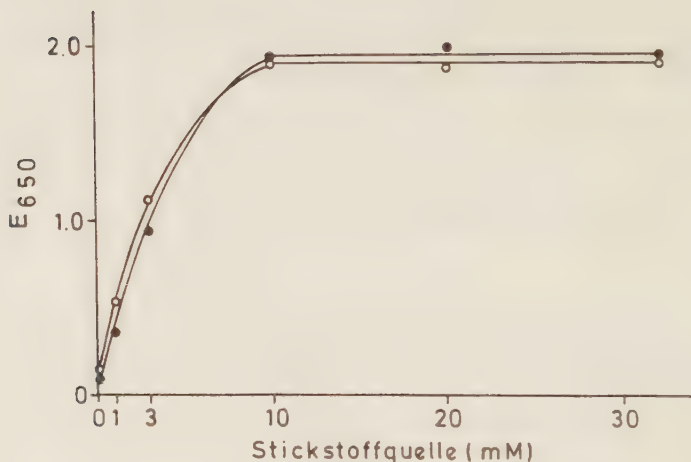


Abb.28. Zellerträge von *Arthrobacter* sp. GLP-1/Nit-1 nach Erreichen der stationären Wachstumsphase mit Glyphosat und Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle. Glyphosat (●); Ammoniumchlorid (○).

8.4. Wachstum von *A. sp.* GLP-1/Nit-1 mit anderen Aminophosphonsäuren als Stickstoffquelle

Der Mutterstamm *A. sp.* GLP-1 konnte keine der angebotenen Aminophosphonsäuren zur Deckung des Stickstoffbedarfs nutzen. Es wurde untersucht, ob die Mutante *A. sp.* GLP-1/Nit-1 außer Glyphosat andere Aminophosphonsäuren als Stickstoffquelle nutzen konnte. Die Verbindungen Aminomethylphosphonsäure, 1- und 2-Aminoethylphosphonsäure, 2-Amino-3-phosphonopropionsäure, 2-Amino-4-phosphonobuttersäure sowie 1- und 4-Amino-butylphosphonsäure konnten alle nicht als Stickstoffquelle genutzt werden. Die Nutzung von Glyphosat als Stickstoffquelle ist demnach eine spezifische Stoffwechselleistung und steht im Gegensatz zur Fülle der Verbindungen, die als Phosphorquelle genutzt werden können (IV 2.1.).

9. Vergleich der Glyphosat- und Phosphataufnahme bei *Arthrobacter* sp. GLP-1 und

der Mutante *Arthrobacter* sp. GLP-1/Nit-1

9.1. Kinetik der Glyphosataufnahme von *A. sp.* GLP-1/Nit-1 in Abhängigkeit von der Phosphor- und Stickstoffquelle im Anzuchtmedium

Der Einfluß von Glyphosat und Phosphat als Phosphorquellen sowie von Glyphosat und Ammoniumchlorid als Stickstoffquellen auf die Kinetik der Glyphosataufnahme wurde untersucht. Aus Abb. 29. wird ersichtlich, daß die Aufnahmeraten unterschiedlich sind. Die höchste Glyphosataufnahme ist nach Wachstum mit Phosphat und Ammoniumchlorid zu beobachten. Die Aufnahmerate ist nach Wachstum mit Glyphosat als Phosphor- und Stickstoffquelle am geringsten. Die Ergebnisse des Versuchs lassen den Schluß zu, daß die Abwesenheit von Glyphosat im Kulturmedium eine leichte Dereprimierung des Aufnahmesystems bedingt.

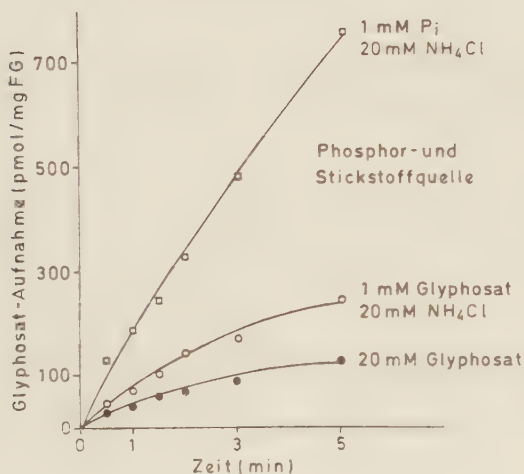


Abb. 29. Glyphosataufnahmekinetiken von *A. sp.* GLP-1/Nit-1 nach Wachstum mit verschiedenen Stickstoff- und Phosphorquellen.

9.2. Vergleich der Phosphataufnahme von *A. sp.* GLP-1 und *A. sp.* GLP-1/Nit-1

Die Bestimmung der K_m -Werte für die Phosphataufnahme bei beiden Stämmen sollte zeigen, ob die Mutagenese einen Einfluß auf die Affinität der Phosphataufnahmesysteme hatte. Zuerst wurden die K_m -Werte der Phosphataufnahme für den Stamm GLP-1 bestimmt. Nach Wachstum in 5 mM Glyphosat ist der K_m -Wert für die Phosphataufnahme $1,6 \mu\text{M}$ mit einer maximalen Aufnahme von $2,8 \mu\text{Mol/min}\cdot\text{mg}$ (Abb. 30). Die Affinität nach Wachstum in 5 mM Phosphat ist etwas geringer ($8,7 \mu\text{M}$), während die Aufnahme um vier Größenordnungen reduziert ist ($0,17 \text{ nMol/min}\cdot\text{mg}$; Abb.31).

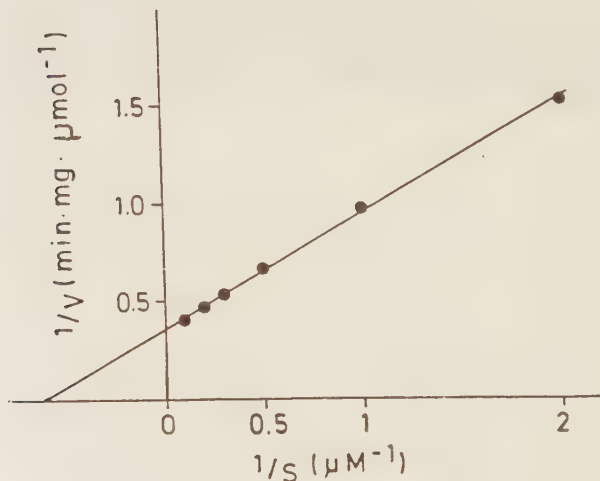


Abb.30. Bestimmung des K_m -Wertes für die Phosphataufnahme bei *A. sp.* GLP-1 nach Wachstum in 5 mM Glyphosat.

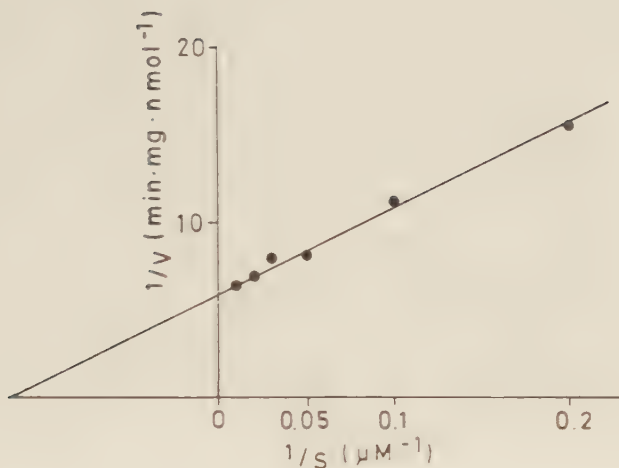


Abb.31. Bestimmung des K_m -Wertes für die Phosphataufnahme bei *A.sp.* GLP-1 nach Wachstum in 5 mM Phosphat.

Die Mutante GLP-1/Nit-1 hat gegenüber Phosphat eine deutlich verringerte Affinität. Die Bestimmung der K_m -Werte nach Wachstum mit Glyphosat als Phosphor- und Stickstoffquelle und mit Phosphat als Phosphorquelle ergeben Werte, die um etwa zwei Größenordnungen über den K_m -Werten des Ausgangsstamms GLP-1 liegen (Abbn. 32, 33). Die Phosphorquelle (Glyphosat oder Phosphat) hat keinen Einfluß auf die maximale Aufnahmerate (1,8 und 2,2 nMol/min·mg) und eine geringe Wirkung auf die Affinität für Phosphat (K_m 590 und 830 μM). Nachdem mit der Charakterisierung der Phosphataufnahme gezeigt wurde, daß der mutierte Stamm in dieser Beziehung verändert war, wurde untersucht, ob ähnliche Unterschiede für die Glyphosataufnahme beider Stämme vorhanden waren.

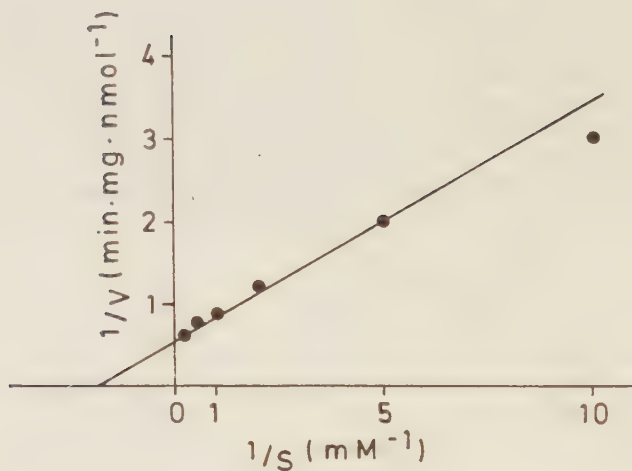


Abb.32. Bestimmung des K_m -Wertes für die Phosphataufnahme von *A. sp.* GLP-1/Nit-1 nach Wachstum in 10 mM Glyphosat (Glyphosat war Stickstoff- und Phosphorquelle).

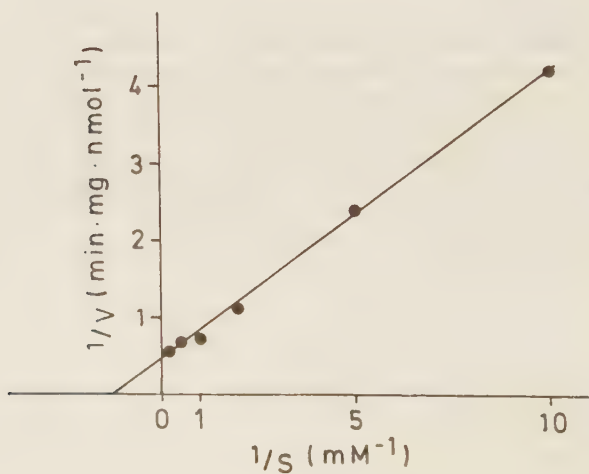


Abb.33. Bestimmung des K_m -Wertes für die Phosphataufnahme von *A. sp.* GLP-1/Nit-1 nach Wachstum in 5 mM Phosphat.

Wie schon erwähnt war der K_m -Wert für die Glyphosat-Aufnahme bei *Arthrobacter* sp. GLP-1 125 μM und der $V_{\max}$ -Wert 0,14 nMol/min-mg (PIPKE, 1984). Ein aktiver Transport des Herbizids nach Wachstum in Phosphat konnte nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte der mutierte Stamm GLP-1/Nit-1 Glyphosat aktiv nach Wachstum in 5 mM Phosphat aufnehmen (Abb. 34). Der K_m -Wert ist mit 105 μM nicht verändert, die Aufnahme rate ist etwas erhöht (0,59 nMol/min-mg). Ähnliches gilt für die Glyphosataufnahme nach Wachstum mit Glyphosat als Phosphor- und Stickstoffquelle (K_m 120 μM ; $V_{\max}$ 0,20 nMol/min-mg). Neben der Bestimmung der Affinität zu Glyphosat wurde die Hemmung des Glyphosattransport durch Phosphat bei *A. sp.* GLP-1/Nit-1 untersucht. Die Resultate der Wachstumsversuche – Abbau des Herbizids in Gegenwart millimolarer Phosphatkonzentrationen – und die verringerte Affinität zu Phosphat sprachen für eine Änderung der Hemmung der Glyphosataufnahme durch Phosphat. Ein direkter Vergleich beider Stämme bezüglich der K_i -Werte für Phosphat war nur nach Wachstum mit Glyphosat als Phosphorquelle möglich. Der K_i -Wert für die Hemmung der Glyphosataufnahme durch Phosphat war bei *A. sp.* GLP-1 24 μM . Die Bestimmung des K_i -Wertes beim mutierten Stamm GLP-1/Nit-1 ist in den Abbildungen 35 – 37 dargestellt.

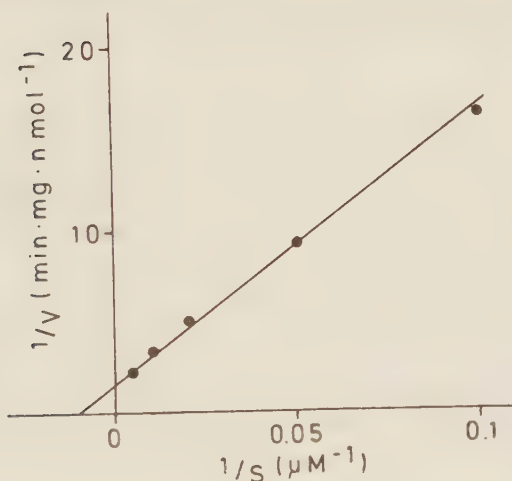


Abb.34. Bestimmung des K_m -Wertes für die Glyphosataufnahme von *A. sp.* GLP-1/Nit-1 nach Wachstum in 5 mM Phosphat.

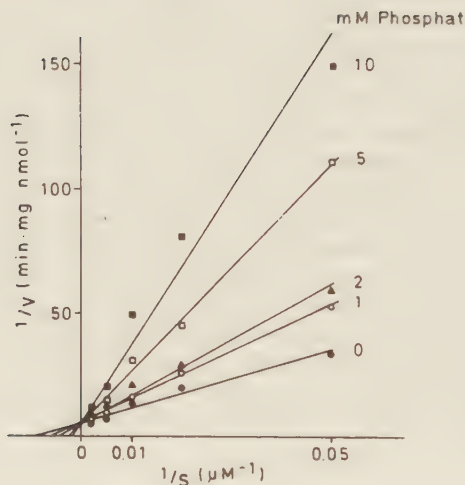


Abb.35. Lineweaver-Burk Diagramm der Hemmung der Glyphosataufnahme durch Phosphat bei *Arthrobacter* sp. GLP-1/Nit-1.

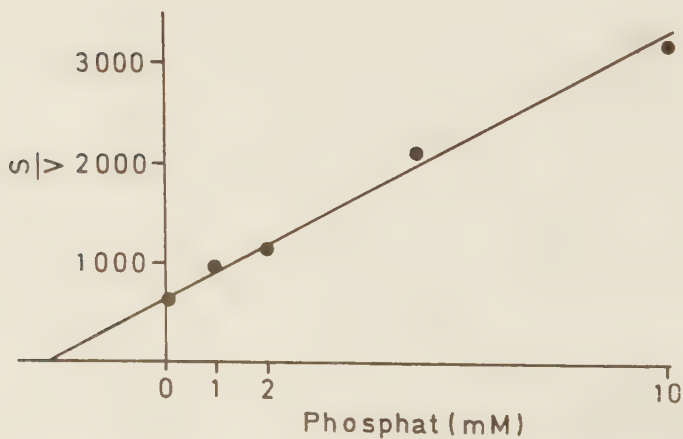


Abb.36. Sekundärdiagramm zu Abb. 35. Die Steigung der in Abb. 35 erhaltenen Geraden ist in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration (Phosphat) dargestellt.

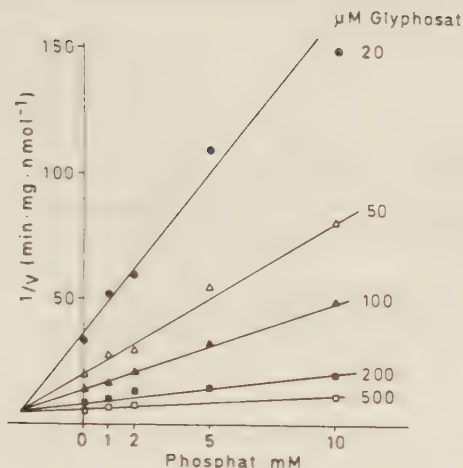


Abb.37. Dixon-Diagramm der Hemmung der Glyphosataufnahme durch Phosphat bei *Arthrobacter* sp. GLP-1/Nit-1.

Aus den vorangegangenen Abbildungen geht hervor, daß die Hemmung der Glyphosataufnahme durch Phosphat kompetitiv ist. Auch beim Ausgangsstamm *A. sp.* GLP-1 wurde eine kompetitive Hemmung beobachtet. Der Unterschied zwischen beiden Stämmen bei der Aufnahme des Herbizids ist daher nicht auf verschiedene Hemmtypen zurückzuführen, sondern nur durch die Affinität des Inhibitors zum Aufnahmesystem begründet. Der K_i -Wert für die Hemmung der Glyphosat-Aufnahme durch Phosphat ist bei dem mutierten Stamm GLP-1/Nit-1 zwei Größenordnungen (2,3 mM) höher als der schon erwähnte K_i -Wert von 24 µM beim Ausgangsstamm. Das Wachstum von GLP-1/Nit-1 mit Glyphosat als Stickstoffquelle in Gegenwart von hohen Phosphatkonzentrationen geht also auf Veränderungen der Phosphataufnahme zurück. Die dreifach erhöhte Glyphosataufnahmerate nach Wachstum mit Phosphat als Phosphorquelle deutet auf eine leichte Dereprimierung des Aufnahmesystems durch Abwesenheit von Glyphosat hin. Alle Parameter zum Glyphosat- und Phosphattransport sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tab. 8. Glyphosat- und Phosphataufnahme in *A. sp.* GLP-1 und *A. sp.* GLP-1/Nit-1

Phosphataufnahme

Stamm	Phosphorquelle	K_m	V_{max}
GLP-1	5 mM Glyphosat	1,6 μM	2,8 $\mu Mol/min \cdot mg$
	5 mM Phosphat	8,7 μM	0,17 nMol/min·mg
GLP-1/Nit-1	10 mM Glyphosat*	590 μM	1,8 nMol/min·mg
	5 mM Phosphat	830 μM	2,2 nMol/min·mg

Glyphosataufnahme

Stamm	Phosphorquelle	K_m	V_{max}	K_i Phosphat
GLP-1	5 mM Glyphosat	125 μM	0,14 nMol/min·mg	24 μM
	5 mM Phosphat	n. n.	n. n.	
GLP-1/Nit-1	10 mM Glyphosat*	120 μM	0,20 nMol/min·mg	2,3 mM
	5 mM Phosphat	105 μM	0,59 nMol/min·mg	

* gleichzeitig Stickstoffquelle

n. n. keine Glyphosataufnahme nachweisbar

9.3. Wachstum von *A. sp.* GLP-1 und *A. sp.* GLP-1/Nit-1 mit limitierenden Phosphatkonzentrationen

Die verringerte Affinität des mutierten Stammes zu Phosphat war Anlaß für die Untersuchung des Wachstum mit geringen Phosphatkonzentrationen. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob die geringe Affinität einen Einfluß auf das Wachstum bei suboptimalen Phosphatkonzentrationen hat. Bei Wachstum mit 1 mM Phosphat war kein Unterschied zwischen dem Ausgangsstamm und der Mutante feststellbar (ohne Abb.) Wie aus Abb. 38 ersichtlich ist, wächst die Mutante bei einer Phosphatkonzentration von 100 μM deutlich langsamer als der Ausgangsstamm GLP-1. Der Vorteil, Glyphosat als Stickstoffquelle nutzen zu können, ist also mit dem Nachteil des langsameren Wachstums bei suboptimalen Phosphatkonzentrationen korreliert.

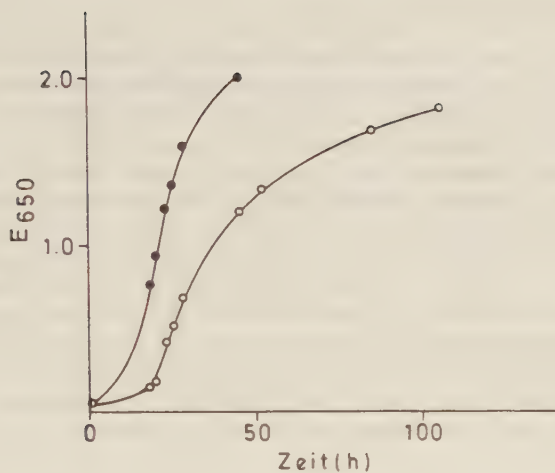


Abb.38. Wachstum von *A. sp. GLP-1* und *A. sp. GLP-1/Nit-1* mit 100 μ M Phosphat als Phosphorquelle, *A. sp. GLP-1* (●); *A. sp. GLP-1/Nit-1* (○).

Anhang

Glyphosataufnahme pflanzlicher Zellkulturen

Bei der Untersuchung von 20 verschiedenen pflanzlichen Zellsuspensionkulturen stellte sich heraus, daß von den getesteten Kulturen nur bei *Catharanthus longifolius* und *Nicotiana glauca* eine, wenn auch geringe Glyphosataufnahme nachweisbar war. Die Aufnahmekinetiken zeigen einen ähnlichen Verlauf wie bei *Arthrobacter* sp. GLP-1. Die Aufnahmeraten bezogen auf das Feuchtgewicht waren allerdings drei Größenordnungen geringer als bei den Bakterien (Abb. 39). Wie zusätzliche Versuche zeigten, war die Glyphosataufnahme mit Konzentrationen von 5 μM bis 2 mM nicht sättigbar. Damit war offensichtlich, daß bei den Zellkulturen ein anderer Mechanismus – möglicherweise Diffusion – die Glyphosataufnahme bewirkte. Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von BURTON und BALKE (1986), die an Suspensionskulturen von Kartoffeln ein sättigbares Glyphosataufnahmesystem (K_m 4,5 μM ; V_{max} 200 pMol/min-g) nachwiesen. Versuche zur Hemmung der Glyphosataufnahme führten BURTON und BLAKE zu der Ansicht, daß das Herbizid ähnlich wie bei *Arthrobacter* sp. GLP-1 (PIPKE et al., 1987b) über ein Phosphattransportsystem aufgenommen wird.

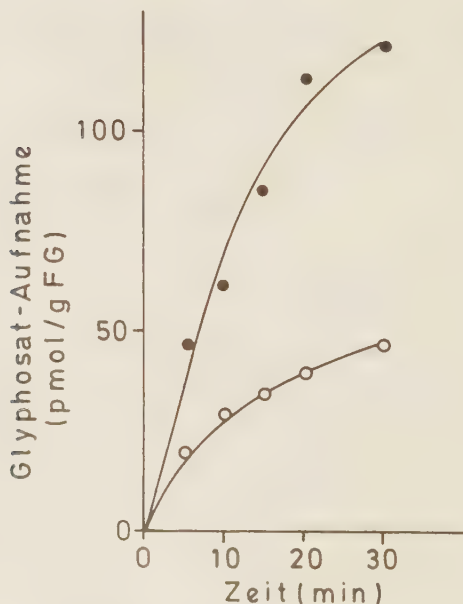


Abb. 39. Glyphosataufnahme zweier pflanzlicher Zellkulturen. Die Glyphosatkonzentration war jeweils 10 μM . *Catharanthus longifolius* (O); *Nicotiana glauca* (●).

V. Diskussion

Organophosphonate, d. h. Substanzen mit einer direkten Verknüpfung von Kohlenstoff und Phosphor (C-P Bindung), finden eine immer breitere Verwendung als Ersatz für die chemisch und biologisch weniger stabilen Organophosphate. Die höhere Stabilität von Organophosphonaten gegen Hydrolyse wird von einem geringeren Molekulargewicht, unterschiedlicher Löslichkeit und im allgemeinen niedrigeren Siedepunkten begleitet (DRAKE et al., 1983). Der Einsatzbereich synthetischer Organophosphonate wird ständig erweitert, so daß man nicht mehr von einer begrenzten Anwendung dieser Verbindungsklasse sprechen kann (einen Überblick über unterschiedliche Anwendungen synthetischer Organophosphonate geben DRAKE et al., 1983.) Die industrielle Bedeutung natürlicher Organophosphonate tritt aufgrund der beschriebenen Entwicklung immer mehr in den Hintergrund.

Zwei der wichtigsten Funktionen natürlicher Phosphonoverbindungen sind die Beteiligung am Lipidstoffwechsel, besonders bei Ciliaten und die Produktion antibakterieller Substanzen durch verschiedene *Streptomyces* Arten. Die Biochemie natürlicher Phosphonate begann mit der Entdeckung von 2-Aminoethylphosphonsäure (2-AEP) durch HORIGUCHI und KANDATSU 1959 in Ciliaten. Die chemische Stabilität von Phosphonoverbindungen veranlaßte CHAVANE schon 1947 zu der Voraussage, daß solche Verbindungen in der Natur vorkommen. Ein Jahr zuvor war die Synthese von 2-AEP durch FINKELSTEIN (1946) gelungen. Die Erkenntnisse über natürliche Phosphonoverbindungen wuchsen schnell und die Bedeutung dieser Verbindungsklasse im Zusammenhang mit dem Lipidstoffwechsel konnte 1963 durch ROUSER et al. und 1964 durch HORI et al. mit der Entdeckung von Ceramid-2-AEP nachgewiesen werden. Es wurden weitere Phosphonat enthaltende Bausteine von Lipiden entdeckt und der Begriff der Phosphonolipide in Analogie zu den Phospholipiden geprägt. Die erste Phosphonoverbindung mit antibakterieller Wirkung war Fosfomycin, eine Substanz, die von *Streptomyces* ausgeschieden wird und früher als Phosphonomycin bezeichnet wurde (HENDLIN et al., 1969). In der Folgezeit wurde eine ganze Reihe weiterer Hemmstoffe beschrieben. Dabei ist generell festzustellen, daß Phosphonate bzw. Phosphinate (charakterisiert durch eine C-P-H Bindung) in Kombination mit einer oder mehreren Aminosäuren (Peptidantibiotika) von Bakterien besser aufgenommen werden, als einfache Phosphonoverbindungen. Bekannte Beispiele dafür sind die Dipeptide Alafosfalin (ALLEN et al., 1978) und Bialaphos (KONDO et al. 1973). Die Peptide werden in den Bakterien durch Peptidasen hydrolysiert und die aktiven Bestandteile 1-Aminoethylphosphonsäure aus Alafosfalin oder Phosphinothricin aus Bialaphos (BAYER et al., 1972) freigesetzt. Neben den antibiotischen Eigenschaften ist die große Bedeutung von Phosphinothricin heute in der Verwendung als Herbizid zu sehen. 2-Amino-4-methylphosphinobuttersäure (Phosphinothricin) wurde schon 1959 von MASTALERZ als starker kompetitiver Hemmstoff der Glutamin-Synthetase entwickelt. Die Hemmung von pflanzlichen Glutamin-Synthetasen durch Phosphinothricin wurde 1982 von LEASON et al. und 1984 von DONN et al. beschrieben und ist stärker als die Hemmung von Glutamin-Synthetasen aus Mikroorganismen.

Im Gegensatz zu Phosphinothricin ist Glyphosat (N-(Phosphonomethyl)glycin) eine synthetische Verbindung mit herbiziden und antibakteriellen Eigenschaften. Glyphosat wurde 1971 von BAIRD et al. eingeführt und findet als Breitbandspektrum-Herbizid

Verwendung. Es ist ein Glycin-Derivat mit einer stabilen C-P Bindung. Die nicht selektiven Eigenschaften von Glyphosat als Herbizid sind in seinem Angriffspunkt in der Zelle begründet. Nachdem durch JAWORSKI (1972) eine Beeinflussung der Biosynthese aromatischer Aminosäuren durch Glyphosat festgestellt wurde, konnten STEINRÜCKEN und AMRHEIN (1980) die 5-Enolpyruvylshikimisäure 3-Phosphat (EPSP) Synthase als Angriffspunkt identifizieren. Weitere Arbeiten zur Charakterisierung der EPSP-Synthase zeigten, daß das Enzym aus Pflanzen und Bakterien gleichermaßen durch Glyphosat gehemmt wird. Organismen, die keinen Shikimisäureweg zur Biosynthese aromatischer Aminosäuren besitzen, insbesondere Insekten und Vertebraten, werden von Glyphosat nicht beeinflusst. Obwohl Glyphosat eine C-P Bindung besitzt, wird es relativ schnell im Boden abgebaut (RUEPPEL et al., 1977). Der wichtigste chemische Abbauschritt von Glyphosat ist die Spaltung der Phosphonobindung. Die Fähigkeit von Mikroorganismen zur Spaltung der C-P Bindung wurde schon 1962 von ZELEZNICK et al. nachgewiesen. Die Autoren berichteten, daß *Escherichia coli* mit Methyl- und Ethylphosphonsäure als Phosphorquelle wachsen konnte. Auch andere Bakterien konnten Phosphonoverbindungen zur Deckung des Phosphorbedarfs spalten (HARKNESS, 1966; COOK et al., 1978). Der erste Bakterienstamm, der Glyphosat als Phosphorquelle nutzen konnte, wurde 1983 von MOORE et al. beschrieben und als *Pseudomonas* Species identifiziert. MOORE et al. benutzen Selektivmedien mit Glyphosat als einziger Phosphorquelle um den gewünschten Stamm zu erhalten. Ein Jahr später isolierten TALBOT et al. (1984) eine Reihe von *Pseudomonas* und *Alcaligenes* Stämmen unter ähnlichen selektiven Bedingungen. Der für große Teile dieser Arbeit verwendete Stamm *Arthrobacter* sp. GLP-1 wurde im Laufe eines Screening-Programms zur Isolierung glyphosatabbauender *Klebsiella pneumoniae* Kulturen entdeckt. Da sich herausstellte, daß der isolierte Stamm eine Kontamination der *Klebsiella* Kulturen war, wurden Versuche zur Identifizierung der Gattung durchgeführt.

Der isolierte Stamm war Gram-positiv, stäbchenförmig, obligat aerob, Katalase und Oxidase positiv, beweglich und bildete keine Sporen. Diese physiologischen und morphologischen Eigenschaften deuteten auf eine Zugehörigkeit zu den coryneformen Bakterien hin (JONES und COLLINS, 1986). Weitere Untersuchungen hatten zum Ziel, zwischen verschiedenen Gattungen coryneformer Bakterien zu differenzieren. Der typische Gestaltwechsel bei den Gattungen *Brevibacterium* und *Arthrobacter* bot dazu ein leicht zu untersuchendes Merkmal. Der in Abb. 2 dargestellte Formwechsel zeigt eindeutig die Entwicklung von kokkoiden ruhenden Zellen über stoffwechselaktive stäbchenförmige Zellen hin zu gealterten kokkoiden Bakterien. Mit diesem Ergebnis war eigentlich eine Einordnung in die Gattung *Arthrobacter* möglich, da Bakterien der Gattung *Brevibacterium* generell unbeweglich sind (JONES und COLLINS, 1986). Trotzdem wurde zusätzlich eine Zellwandanalyse durchgeführt, um eine sichere Unterscheidung zwischen beiden Gattungen zu ermöglichen. Die Analyse der Zellwandaminosäuren bestätigte die Einordnung des Isolats in die Gattung *Arthrobacter*. Es konnten keine Hinweise auf die für *Brevibacterien* typische Diaminopimelinsäure gefunden werden. Die dünnschichtchromatische Auftrennung der Zellwandaminosäuren sprach eher für das Vorhandensein von Lysin (Abb. 3).

Die Untersuchung der Ultrastruktur des isolierten Stammes wurde hauptsächlich durchgeführt, um den Einfluß von Glyphosat auf die Morphologie der Bakterien zu untersuchen. Aus Abb. 4 geht hervor, daß bis auf die Bildung von Polyphosphaten bei Wachstum

in 5 mM Orthophosphat als Phosphorquelle kein Einfluß auf die Morphologie festzustellen ist. Nach Wachstum mit 5 mM Glyphosat als Phosphorquelle konnten die Bakterien kein Phosphat speichern. Die ultrastrukturellen Ergebnisse entsprechen Resultaten aus Wachstumsversuchen. Bakterien, die nach Wachstum in 5 mM Phosphat in Medium ohne Phosphorquelle kultiviert wurden, zeigten deutliches Wachstum und konnten sich noch mehrmals teilen. Im Gegensatz dazu waren Bakterien, die mit Glyphosat als Phosphorquelle wuchsen und dann in Medium ohne Phosphorquelle überführt wurden, nicht mehr zu Zellteilungen fähig, da sie offensichtlich kein Phosphat gespeichert hatten.

Wie eingangs schon erwähnt ist der Angriffspunkt von Glyphosat die EPSP-Synthase. Die EPSP-Synthase katalysiert den reversiblen Transfer eines Enolpyruvylrestes von Phosphoenolpyruvat auf Shikimisäure 3-Phosphat unter Bildung von 5-Enolpyruvylshikimisäure 3-Phosphat und Orthophosphat. Der Einfluß von Glyphosat auf das Wachstum von zehn verschiedenen *Arthrobacter* Stämmen wurde untersucht und mit vorhandenen Ergebnissen für andere Organismen verglichen. Der Einfluß von Glyphosat auf die Generationszeit ist sehr unterschiedlich. Das Wachstum von *A. oxydans* (DSM 420) und *A. paraffineus* (ATCC 21298) wird durch 5 mM Glyphosat nicht beeinflusst, während die Generationszeit bei *A. globiformis* (DSM 20124) und *A. variabilis* (DSM 20132) durch 5 mM Glyphosat drei- bis viermal länger wird (Tabelle 1). Eine Verlängerung der Generationszeit durch Glyphosat wurde auch bei verschiedenen anderen Bakterienstämmen wie *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* und *Streptococcus lactis* beobachtet (SCHULZ et al., 1985). Im Gegensatz dazu konnten die Autoren keine Wachstumshemmung bei fünf von sechs getesteten *Pseudomonas* Stämmen feststellen. Der einzige glyphosatsensitive Stamm war *P. fluorescens*. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche korrelierten mit der Ausscheidung von Shikimisäure und Shikimisäure 3-Phosphat in das Kulturmedium der Bakterien. Dieses Phänomen wurde zuerst von AMRHEIN et al. (1983) bei glyphosattoleranten Bakterien und pflanzlichen Zellkulturen beobachtet. Die Toleranz von *Klebsiella pneumoniae* gegenüber Glyphosat wurde durch eine erhöhte EPSP-Synthase Aktivität verursacht. Gleichzeitig wurden große Mengen von Shikimisäure 3-Phosphat in das Kulturmedium ausgeschieden (AMRHEIN et al., 1983). Die Untersuchung der verschiedenen von SCHULZ et al. (1985) beschriebenen Stämme und die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, daß die im Medium der Bakterien meßbaren Konzentrationen von Shikimisäure und Shikimisäure 3-Phosphat mit der Wachstumshemmung und der Sensitivität der EPSP-Synthasen korrelieren. Zum Beispiel scheiden die glyphosatsensitiven Stämme von *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* (SCHULZ et al., 1985) und *Arthrobacter globiformis* und *A. atrocyaneus* (diese Arbeit) bis zu 2 mM Shikimisäure in das Kulturmedium aus, wenn die Bakterien in Gegenwart von 5 mM Glyphosat kultiviert werden. Stämme mit einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Glyphosat, zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* (SCHULZ et al., 1985) oder *Arthrobacter paraffineus* und *A. sp.* GLP-1 (diese Arbeit), scheiden weder Shikimisäure noch Shikimisäure 3-Phosphat aus (Tabelle 1). Wie schon angedeutet, korrelieren die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit der unterschiedlichen Sensitivität der EPSP-Synthasen aus den verschiedenen Bakterien. Ein Vergleich der I_{50} -Werte, daß sind diejenigen Glyphosatkonzentrationen, die eine 50 prozentige Hemmung der EPSP-Synthase im

Rohextrakt hervorrufen, zeigt Unterschiede von zwei Größenordnungen. Für die *Pseudomonaden* ermittelten SCHULZ et al. I_{50} -Werte von ca. 10 mM (Ausnahme *P. fluorescens*), während die I_{50} -Werte der übrigen Stämme im Bereich von 0,1 mM Glyphosat lagen. Für die untersuchten *Arthrobacter* Stämme wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, obwohl die Unterschiede um zwei Größenordnungen hier innerhalb einer Gattung gemessen wurden (Abb. 5, Tab. 2). Leider ist ein Vergleich der Wachstumsparameter und der Hemmung des Wachstums durch Glyphosat zwischen den hier beschriebenen Stämmen und anderen Stämmen, die Glyphosat als Phosphorquelle nutzen können (MOORE et al., 1983; TALBOT et al., 1984), nicht möglich, da solche Untersuchungen im Rahmen der angesprochenen Arbeiten nicht durchgeführt wurden.

Neben *A. sp. GLP-1* war auch der Stamm *Arthrobacter atrocyaneus* in der Lage, das Herbizid Glyphosat als Phosphorquelle zu nutzen. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche und Messungen der EPSP-Synthase zeigten, daß *A. atrocyaneus* glyphosatsensitiv ist. Die Messung der Generationszeit mit steigenden Glyphosatkonzentrationen (Abb. 6) zeigt eine deutliche Verlangsamung des Wachstums ab etwa 3 mM Glyphosat. Im Gegensatz dazu wird das Wachstum von *A. sp. GLP-1* erst ab Glyphosatkonzentrationen von 30 mM gehemmt (PIPKE, 1984). Die Ursache hierfür liegt in der unterschiedlichen Sensitivität der EPSP-Synthasen. Die I_{50} -Werte sind 0,2 mM für *A. atrocyaneus* und 11,9 mM für *A. sp. GLP-1* (Tab. 2).

Glyphosat kann von allen bisher untersuchten Bakterien, die mit dem Herbizid als Phosphorquelle wachsen können, genauso effizient genutzt werden wie Orthophosphat. Dies gilt für *A. atrocyaneus* (Abb. 7) ebenso wie für *A. sp. GLP-1* (PIPKE, 1984) und *Pseudomonas* PG 2982 (MOORE et al., 1983).

Das Spektrum verschiedener Phosphonoverbindungen, die von den beiden *Arthrobacter* Stämmen als Phosphorquelle genutzt werden, zeigt große Unterschiede. Während *A. sp. GLP-1* von 20 getesteten Phosphonaten alle zur Deckung des Phosphorbedarfs abbauen kann, ist *A. atrocyaneus* lediglich zum Wachstum mit Glyphosat, Aminomethylphosphonsäure und 1-Aminobutylphosphonsäure als Phosphorquelle fähig (Tab. 3). Interessant ist der Abbau von 20 Phosphonaten durch *A. sp. GLP-1*, da die Gruppe der angebotenen Phosphonoverbindungen sehr heterogen ist. Das Spektrum reicht von Aminophosphonsäuren, Alkylphosphonsäuren, Antibiotika (Fosfomycin, 1-AEP) hin bis zu Komplexbildnern mit mehr als einer Phosphonogruppe. Der Abbau von einigen Komplexbildnern wurde weiter untersucht, um festzustellen, ob *A. sp. GLP-1* alle der vorhandenen Phosphonogruppen zur Deckung des Phosphorbedarfs nutzen konnte. Erste Wachstumsversuche zeigten jedoch, daß immer nur eine Phosphonogruppe unabhängig von der Anzahl der vorhandenen Phosphonogruppen (siehe III) verstoffwechselt wurde. Dieses überraschende Ergebnis konnte durch Arbeiten von WEIBENFELS (1987) für den Abbau von Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure) (EDTP) durch *A. sp. GLP-1* bestätigt werden. Durch die Verwendung von radioaktiv markiertem EDTP und Untersuchungen mit NMR-Spektroskopie gelang es WEIBENFELS, N-Methylethylendiamintri(methylenphosphonsäure) als Abbauprodukt von EDTP zu identifizieren. Warum von dem symmetrischen Molekül EDTP nur jeweils eine der vier gleichwertigen Phosphonogruppen abgespalten wird und kein weiterer Abbau der dreifach phosphorylierten Verbindung stattfindet, konnte nicht geklärt werden. In einer kürzlich erschienen Arbeit (KISHORE und JACOB, 1987) wird auch für *Pseudomonas* PG 2982 die Nutzung von 12 sehr unterschiedlichen Phosphonaten als Phosphorquelle beschrieben.

Zu Beginn dieser Arbeit war über den Stoffwechsel von Glyphosat nur wenig bekannt. Eigene Untersuchungen (PIPKE, 1984) belegten die Beteiligung des C₁-Stoffwechsels am Abbau von Glyphosat durch *Arthrobacter* sp. GLP-1. Wenig später erschien eine Arbeit von JACOB et al. (1985), die ebenfalls die Beteiligung von Tetrahydrofolsäure am Metabolismus von Glyphosat in dem von MOORE et al. 1983 isolierten Stamm *Pseudomonas* PG 2982 dokumentierte. Im Gegensatz zu eigenen Untersuchungen mit [³¹⁴C]Glyphosat arbeiteten JACOB et al. mit Glyphosat, welches jeweils zwei stabile Isotope ([¹³C] und [¹⁵N]) enthielt. Durch *in vivo* NMR-Studien konnten sie Aussagen über den Stoffwechsel des Glycin-Restes von Glyphosat machen. Die Ergebnisse belegten, daß die Methyl-Gruppe über den C₁-Stoffwechsel metabolisiert wird und der Glycin-Rest über bekannte Stoffwechselwege abgebaut wird (Abb. 40). Ergänzende Versuche zum Glyphosatabbau durch *A. sp.* GLP-1 unter Verwendung der gleichen Technik zeigten eine weitgehende Übereinstimmung im Glyphosatmetabolismus von *P. PG* 2982 und *A. sp.* GLP-1 (PIPKE et al., 1987a).

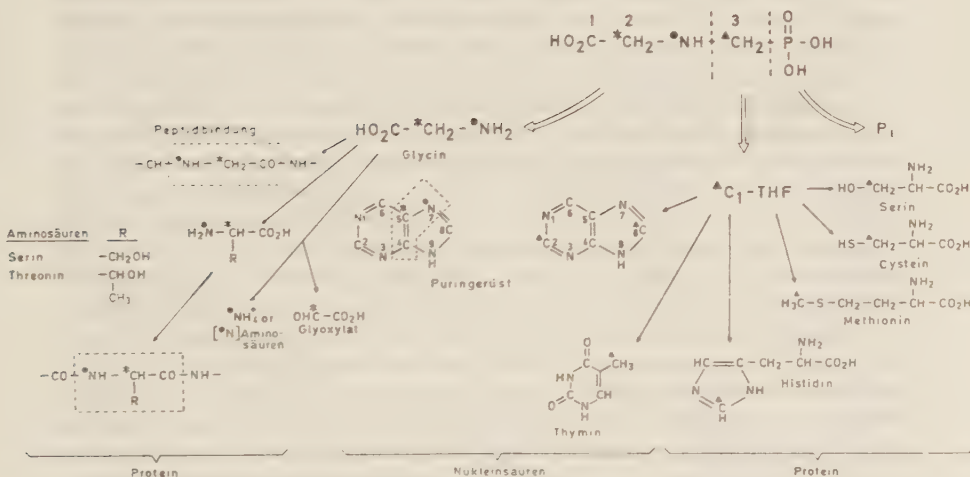


Abb.40. Abbau von Glyphosat durch *Pseudomonas* PG 2982 und *Arthrobacter* sp. GLP-1. Die Ergebnisse wurden durch radiochemische Analysen mit [³¹⁴C]Glyphosat und NMR-Spektroskopie mit [²¹³C,¹⁵N]Glyphosat bzw. [³¹³C,¹⁵N]Glyphosat ermittelt. (aus PIPKE et al., 1987a)

Die in Abb. 40 zusammengefaßten Ergebnisse geben zwar die beteiligten Stoffwechselwege wieder, Aussagen über die ersten Abbauschritte sind jedoch nicht möglich. Die mit den dargelegten Resultaten (Abb. 40) im Einklang stehenden Mechanismen zur Bildung eines C₁-Fragmentes und Glycin durch *A. sp.* GLP-1 sind in Abb. 8 dargestellt und waren Grundlage zur Identifizierung des ersten Abbauproduktes der Glyphosat-spaltung. Die Entstehung von Sarcosin (N-Methylglycin) als erstes Produkt beim Abbau von Glyphosat konnte durch analytische Methoden (DC, Aminosäurenanalyse Abb. 9) und durch enzymatischen Abbau (Abb. 10) verifiziert werden. Neuere Publikationen von SHINABERGER und BRAYMER (1986) und KISHORE und JACOB (1987) dokumentierten auch für *Pseudomonas* PG 2982 die Bildung von Sarcosin als Intermediat des Glyphosat-abbaus.

Die Bildung von Sarcosin aus Glyphosat impliziert die Spaltung der C-P Bindung als ersten Abbauschritt. Es wurde daher versucht, eine Enzymaktivität, die die C-P Bindung spalten kann (C-P Lyase) in Rohextrakten von *Arthrobacter* sp. GLP-1 nachzuweisen. Trotz vielfältiger Bemühungen und der Anwendung verschiedener Aufschlußtechniken gelang der Nachweis einer C-P Lyase *in vitro* nicht. Auch Anstrengungen von mehreren Arbeitsgruppen, eine ähnliche Enzymaktivität bei anderen Bakterien zellfrei nachzuweisen, waren erfolglos. So versuchten DAUGHTON et al. (1979) in *Pseudomonas testosteroni*, MOORE et al. (1983) und SHINABERGER und BRAYMER (1986) in *Pseudomonas* PG 2982, FROST et al. (1987) in *Escherichia coli* und WACKETT et al. (1987) in *Agrobacterium radiobacter* vergeblich, eine C-P Lyase *in vitro* zu messen. Die Ursache für das Scheitern ist wahrscheinlich auf die im allgemeinen geringe Aktivität und auf die extreme Labilität einer C-P Lyase Aktivität zurückzuführen. Den Vorschlag einer radikalischen Dephosphorylierung als Mechanismus zum Abbau von Organophosphonaten machten CORDEIRO et al. 1986. Die Autoren untersuchten Mischungen von Abbauprodukten, die nach Wachstum von *E. coli* mit Alkylphosphonaten als Phosphorquelle erhalten wurden. Vergleichbare Reaktionsprodukte wurden durch die Reaktion von Bleitetraacetat mit Alkylphosphonaten erhalten. Eine weitergehende Analyse der radikalischen Dephosphorylierung durch FROST et al. (1987) zeigte jedoch, daß die chemischen Bedingungen für eine radikalische Dephosphorylierung (Anwesenheit von Bleitetraacetat, hohe Temperaturen oder hohe elektrochemische Oxidationspotentiale) sehr weit von physiologisch zu erwartenden Bedingungen abwichen. Außerdem konnte der Abbau von einigen Phosphonaten nicht mit radikalischer Dephosphorylierung erklärt werden, so daß dieser Mechanismus nicht den Stoffwechsel der sehr unterschiedlichen Phosphonate (KISHORE und JACOB., 1987, diese Arbeit) erklären konnte. Das einzige Beispiel für die Spaltung einer C-P Bindung *in vitro* bleibt daher gegenwärtig der Abbau von 2-Aminoethylphosphonsäure (2-AEP) in Zellextrakten von *Bacillus cereus*. Das von LA NAUZE et al. (1970) isolierte Enzym Phosphonoacetaldehyd Hydrolase (EC 3.11.1.1) ist hochspezifisch für Phosphonoacetaldehyd, dem Transaminierungsprodukt von 2-AEP. Der Abbau von anderen Phosphonaten durch *B. cereus* konnte nicht beobachtet werden. Der Metabolismus der natürlichen Phosphonoverbindung 2-AEP ist verglichen mit den oben angeführten Ergebnissen zum Abbau von Phosphonaten *in vitro* sicher eine Ausnahmeerscheinung.

Da Versuche zum Nachweis einer C-P Lyase Aktivität in Rohextrakten von *A. sp. GLP-1* erfolglos waren, wurde versucht, diese Enzymaktivität *in vivo* zu messen. Es konnte ein Testsystem zum Abbau von Glyphosat etabliert werden (Abb. 11). Entscheidend für die Messung der C-P Lyase war die Hemmung des Stoffwechsels von Sarcosin, das neben Orthophosphat ein Abbauprodukt von Glyphosat ist. Die Spaltung von Sarcosin in ein C₁-Fragment (Formaldehyd) und Glycin wurde durch Hemmung des Enzyms Sarcosin-Oxidase mit Acetat verhindert. Auf diese Weise wurde nur der erste Abbauschritt von Glyphosat, die Spaltung der C-P Bindung mit den Produkten Sarcosin und Phosphat, gemessen. Eine Verbesserung des *in vivo* Systems wurde durch die Permeabilisierung der Bakterienzellen erreicht (Abb. 11). Die Diffusion von Sarcosin aus den Bakterien in das Medium, von dem Proben für die Bestimmung der Aktivität eingesetzt wurden, konnte durch Zugabe von Dimethylsulfoxid erhöht werden. Die Sarcosinbildung war abhängig von der Inkubationszeit, der eingesetzten Glyphosatkonzentration und der eingesetzten Zellzahl bzw. Proteinmenge (Abb. 12,13). Daher konnte ein apparenter K_m-Wert für die C-P Lyase bestimmt werden (Abb. 14). Der K_m-Wert für die Sarcosinbildung aus Glyphosat war 61 µM, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug 2,2 pMol/sec·mg Protein. Ein Vergleich mit anderen Organismen oder Testsystemen ist nicht möglich, da der Nachweis einer C-P Lyase *in vivo* außer für *Arthrobacter sp. GLP-1* bisher für keinen anderen Organismus beschrieben worden ist. Neben der C-P Lyase wurde der Einfluß von Glyphosat auf die Aktivität der Sarcosin-Oxidase untersucht. Mit Glyphosat als Phosphorquelle nahm die Aktivität gegenüber Phosphat als Phosphorquelle etwa um den Faktor 3 zu (Tab. 5). Die Sarcosin-Oxidase aus *A. sp. GLP-1* ist am Abbau von Glyphosat als zweites Enzym nach der Abspaltung der Phosphonogruppe durch die C-P Lyase beteiligt. Eine identische Regulation wurde beim Glyphosatabbau durch *Pseudomonas* PG 2982 festgestellt (SHINABERGER und BRAYMER, 1986). Die Aktivität der Sarcosin-Oxidase aus *P. PG 2982* war nach Wachstum mit Glyphosat etwa sechsmal höher als nach Wachstum mit Phosphat. Der Metabolismus von Glyphosat in *Arthrobacter sp. GLP-1* und *Pseudomonas* PG 2982 ist sehr ähnlich. Der einzige Unterschied im Abbau des Herbizids ist die Freisetzung von radioaktiv markiertem CO₂ aus [3¹⁴C]Glyphosat durch *Pseudomonas* PG 2982 (SHINABERGER und BRAYMER, 1986). Eine Freisetzung von CO₂ aus Glyphosat durch *Arthrobacter sp. GLP-1* konnte nicht beobachtet werden (PIPKE, 1984; SCHULZ, 1986).

Der Stoffwechsel von Glyphosat in *Arthrobacter atrocyaneus* unterscheidet sich dagegen völlig vom Stoffwechsel des Herbizids in den vorher beschriebenen Bakterien. Im Gegensatz zu *A. sp. GLP-1* hat *A. atrocyaneus* eine glyphosatsensitive EPSP-Synthase. Das Spektrum der von *A. atrocyaneus* abbaubaren Phosphonoverbindungen ist verglichen mit den Stoffwechselleistungen von *A. sp. GLP-1* und *P. PG 2982* viel kleiner. Der Glyphosatabbau durch *A. atrocyaneus* verläuft über die Bildung von Amino-methylphosphonsäure (AMPA) als Zwischenprodukt. Die Identifizierung von AMPA als Produkt der Spaltung von Glyphosat gelang durch Aminosäurenanalyse (Abb. 16) und durch den Vergleich des dansylierten Intermediats mit dansyliertem authentischem AMPA mittels Dünnschichtchromatographie (Abb. 17). Ein vergleichbarer Metabolismus von Glyphosat ist für ein *Flavobacterium* beschrieben worden (BALTHAZOR und HELLAS, 1986). Dieser Organismus wurde aus Klärschlamm zur Beseitigung von Glyphosat-

rückständen isoliert und als *Flavobacterium* identifiziert. Das *Flavobacterium* baut Glyphosat in Anwesenheit von Phosphat zu AMPA ab. Die Mineralisierung von AMPA und damit die Spaltung der C-P Bindung zu Ammoniumstickstoff, CO_2 und Phosphat findet jedoch nur in Abwesenheit von Phosphat statt. Dieser Weg der Regulation des Glyphosatabbaus unterscheidet sich von der Regulation bei *Arthrobacter atrocyaneus*. Die Anwesenheit von Phosphat reprimiert bei diesem Organismus die Spaltung von Glyphosat in AMPA und eine C_2 -Einheit (Abb. 18). Der weitere Abbau von AMPA durch *A. atrocyaneus* konnte über die Bildung von radioaktivem CO_2 aus $[3^{14}\text{C}]$ Glyphosat verfolgt werden (Abb. 19). Eine Inkorporation von Radioaktivität aus Glyphosat in zelluläre Bestandteile von *A. atrocyaneus* konnte nicht nachgewiesen werden. Auch in diesem Punkt unterscheiden sich die Mechanismen des Glyphosatstoffwechsels von *A. atrocyaneus* und *A. sp. GLP-1* sowie *Pseudomonas* PG 2982 (Abb. 40). Erwartungsgemäß hat der Abbau von Glyphosat durch *A. atrocyaneus* keinen Einfluß auf die Aktivität der Sarcosin-Oxidase (Tab. 5), da Sarcosin als Intermediat keine Rolle spielt.

Die Bedeutung der in dieser Arbeit vorgestellten Abbauewege für das Herbizid Glyphosat im Hinblick auf den Glyphosatabbau im Boden ist wahrscheinlich gering. Beide Bakterienstämme (*A. sp. GLP-1* und *A. atrocyaneus*) bauen das Herbizid nur ab, wenn kein Phosphat im Kulturmedium vorhanden ist. Ähnliches gilt für den Glyphosatabbau durch *Pseudomonas* PG 2982 und einer *Flavobacterium* Species. Obwohl das *Flavobacterium* Glyphosat in Gegenwart von Phosphat zu AMPA abbaut, wird die C-P Bindung von AMPA erst gespalten, wenn kein Phosphat vorhanden ist. In diesem Zusammenhang muß noch erwähnt werden, daß *A. atrocyaneus* der einzige glyphosatabbauende Bakterienstamm ist, der nicht nach Selektion auf Medien mit Glyphosat als Phosphorquelle entdeckt wurde. Vielmehr ist der hier untersuchte Stamm schon 1956 von KUHN und STARR als neue, den Farbstoff Indigoidin produzierende Art beschrieben und hinterlegt worden. Da Glyphosat erst 1971 eingeführt wurde, ist ein Kontakt von *A. atrocyaneus* mit dem Herbizid auszuschließen. Ein Bakterienstamm, der für den Glyphosatabbau im Boden von Bedeutung sein soll, muß die C-P Bindung des Herbizids in Gegenwart von Phosphat spalten können. Ein anderer Weg wäre der Cometabolismus von Glyphosat durch zwei Bakterienstämme. Für die Bildung von AMPA in Gegenwart von Phosphat käme die angesprochene *Flavobacterium* Species in Frage. Ein Bakterium, welches AMPA in Gegenwart von Phosphat mineralisieren kann, ist bisher allerdings noch nicht beschrieben worden.

Die Aufnahme von Glyphosat ist bisher nur für *Arthrobacter sp. GLP-1* untersucht worden (PIPKE, 1984). Die ersten Ergebnisse zeigten, daß Phosphat das Glyphosataufnahmesystem reprimiert und zusätzlich ein kompetitiver Hemmstoff des Glyphosattransports ist (K_m Glyphosat 125 μM ; K_i Phosphat 24 μM). Auch AMPA ist ein kompetitiver Hemmstoff der Glyphosataufnahme (K_i 50 μM ; PIPKE, 1984). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Glyphosattransport weiter charakterisiert. Wie schon zu Beginn dieses Abschnittes erwähnt, reprimiert Phosphat das Glyphosataufnahmesystem. Versuche zur Induktion der Glyphosataufnahme nach Wachstum in verschiedenen Phosphorquellen zeigten, daß die Glyphosataufnahme auch durch den Phosphatester Glucose 6-Phosphat reprimiert wird. Durch Inkubation in Medium ohne Phosphorquelle

wird das Glyphosataufnahmesystem induziert. Dabei zeigt sich, daß die Aufnahme­rate von Zellen, die mit Glyphosat oder AMPA als Phosphorquelle wuchsen, ebenfalls steigt (Abb. 20). Ergänzende Experimente zur Induktion der Glyphosataufnahme belegen, daß bei der Induktion Proteinbiosynthese beteiligt ist (Abb. 21). Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist nicht von Glyphosat im Kulturmedium abhängig. Für die Induktion des Enzyms nach Wachstum mit Glyphosat als Phosphorquelle ist wahrscheinlich die Abwesenheit von Phosphat verantwortlich, da ein Vergleich der Enzymaktivitäten nach Inkubation ohne Phosphorquelle und Inkubation mit Glyphosat keinen Unterschied zeigt (Tab. 6). Die Glyphosataufnahme ist abhängig vom pH-Wert und hat ein Optimum bei pH 6,0 – 6,5 (Abb. 23). Dieses Optimum deutet auf eine bevorzugte Aufnahme von Glyphosat als Dianion hin (WAUCHOPE, 1976). Der Transport von Glyphosat ist nicht abhängig von der Komplexbildung zwischen Glyphosat und divalenten Metallionen (Tab. 7). Die Anwesenheit von Ni^{2+} erhöhte die Aufnahme­rate, während Zn^{2+} den Glyphosat­transport hemmt. Die Stabilität der Glyphosat-Metallkomplexe korreliert nicht mit den Änderungen der Aufnahme­raten (MOTEKAITIS und MARTELL, 1985).

Der Transport von Glyphosat in *Arthrobacter* sp. GLP-1 unterscheidet sich vom Transport von 2-Aminoethylphosphonsäure (2-AEP) in *Bacillus cereus* und *Pseudomonas aeruginosa*, beides Bakterien, die 2-AEP als Phosphorquelle nutzen können. Die Aufnahme von 2-AEP in *B. cereus* war durch 2-AEP und AMPA induzierbar und wurde durch Phosphat reprimiert (ROSENBERG und LA NAUZE, 1967). In *P. aeruginosa* induzierte 2-AEP das Aufnahmesystem und Phosphat hatte keinen Einfluß (LACOSTE et al., 1976). In *P. aeruginosa* war der K_m -Wert für die Aufnahme von 2-AEP 6,2 μM , der K_i -Wert für Phosphat 1 mM. Die Affinität für 2-AEP war in *B. cereus* noch höher (K_m 0,1 μM) und Phosphat war kein Inhibitor der Aufnahme. Die Affinität für Glyphosat in *Arthrobacter* sp. GLP-1 ist mit einem K_m -Wert von 125 μM wesentlich geringer. Phosphat hat eine hohe Affinität zum Glyphosataufnahmesystem in *A. sp.* GLP-1 (K_i 24 μM), eine geringe Affinität zum Aufnahmesystem für 2-AEP in *Pseudomonas aeruginosa* und keine Affinität zum Aufnahmesystem für 2-AEP in *Bacillus cereus*. Trotz dokumentierter Bemühungen (SCHULZ, 1986 für *Klebsiella pneumoniae*; FOLWACZNY, 1986 für *Escherichia coli*) konnte die Aufnahme von Glyphosat in diesen Bakterien nicht nachgewiesen werden. Eigene Untersuchungen zeigten, daß der Transport von Glyphosat in diesen Bakterien meßbar ist, wenn sie 4 Stunden in Medium ohne Phosphorquelle inkubiert wurden (Abb. 22). Die Aufnahme­raten von *K. pneumoniae*, *E. coli* und *A. sp.* GLP-1 sind nach der Inkubation in phosphorfremem Medium gleich. Da beide untersuchten Stämme durch Glyphosat im Wachstum gehemmt werden, muß das Herbizid in die Zellen gelangen. Möglicherweise sind die aufgenommenen Mengen von Glyphosat unter physiologischen Bedingungen so gering, daß die Empfindlichkeit des Meßsystems für den Glyphosat­transport nicht ausreicht, eine Aufnahme nachzuweisen.

Ein Bericht von BURTON und BALKE (1986) über die spezifische Glyphosataufnahme in einer Zellsuspensionskultur von Kartoffeln war Anlaß für die Untersuchung des Glyphosat­transports in anderen Zellkulturen. Ältere Arbeiten zum Glyphosat­transport in Pflanzen oder pflanzlichen Zellkulturen zeigten, daß die Aufnahme von Glyphosat sehr gering und nur nach längerer Inkubationszeit meßbar war (BRECKE und DUKE, 1980; NAFZIGER et al., 1984). Im Vergleich zur Glyphosataufnahme in *Arthrobacter* sp. GLP-1

ist die Aufnahme in Zellkulturen von *Catharanthus longifolius* und *Nicotiana glauca* wesentlich geringer (vergleiche Anhang Abb. 39). Die Glyphosataufnahme war im Bereich von 5 μM bis 2 mM nicht sättigbar und unterscheidet sich damit von der Glyphosataufnahme in Kartoffelsuspensionskulturen (BURTON und BALKE, 1986), die durch einen K_m -Wert von 4,5 μM und eine maximale Aufnahme von 200 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$ charakterisiert ist. Für die Kartoffelsuspensionskultur konnte von den Autoren ein "Carrier"-abhängiger Transport wahrscheinlich gemacht werden. Der Mechanismus der Glyphosataufnahme bei den untersuchten Zellkulturen ist nicht eindeutig festzustellen. Für die gemessene Glyphosataufnahme kann ein sehr unspezifischer "Carrier" oder Diffusion verantwortlich sein.

Ein anderer Aspekt der Glyphosataufnahme war die Frage, ob das Herbizid unverändert in die Bakterienzelle gelangt oder ob schon bei der Aufnahme die Spaltung der C-P Bindung stattfindet. Der Nachweis von Glyphosat in Extrakten von *A. sp. GLP-1* deutete auf eine Trennung von Glyphosataufnahme und -abbau hin (Abb. 24). Diese Vermutung wurde durch die parallele Messung von Glyphosataufnahme und C-P Lyase bestätigt. Die Induktion der Glyphosataufnahme nach Inkubation in Medium ohne Phosphorquelle (Abb. 25,26) ist von der Aktivität der C-P Lyase getrennt reguliert. Damit konnte demonstriert werden, daß der Transport des Herbizids und die Spaltung der Phosphonbindung in Glyphosat zwei getrennte Prozesse sind.

Im Laufe der Diskussion wurde schon erwähnt, daß Glyphosat nur abgebaut wird, wenn kein Phosphat im Medium vorhanden ist. Wie Versuche zur Nutzung von verschiedenen Stickstoffquellen für das Wachstum von *Arthrobacter sp. GLP-1* ergaben, konnte zwar Sarcosin, nicht jedoch Glyphosat als Stickstoffquelle genutzt werden. Die Ursache dafür ist der unterschiedliche Bedarf an Phosphor und Stickstoff. Während Phosphatkonzentrationen von 0,1 mM maximales Wachstum ermöglichen, ist eine Sarcosinkonzentration von 10 mM nötig, um eine vergleichbare Zellzahl zu erhalten. Die Nutzung von Glyphosat als Stickstoffquelle über den Abbau zu Sarcosin würde die Freisetzung einer entsprechenden Phosphatmenge bedeuten. Die Freisetzung von millimolaren Phosphatkonzentrationen würde jedoch die Aufnahme von Glyphosat durch *A. sp. GLP-1* völlig hemmen. Um einen Bakterienstamm zu erhalten, der Glyphosat in Gegenwart von Phosphat aufnehmen kann, wurde aus den oben angeführten Gründen nach Mutanten selektiert, die das Herbizid als Stickstoffquelle nutzen können. Eine Vielzahl von Versuchen mit unterschiedlichen Mutagenesetechniken führte zur Isolierung der gewünschten Mutante, die als *A. sp. GLP-1/Nit-1* bezeichnet wurde. Die Analyse des Wachstums der Mutante zeigte, daß das langsame Wachstum mit der Ausscheidung von Phosphatmengen korreliert ist, die den aufgenommenen Glyphosatzmengen entsprechen (Abb. 27). *A. sp. GLP-1/Nit-1* konnte Glyphosat genauso effektiv als Stickstoffquelle nutzen wie Ammoniumstickstoff (Abb. 28). Ähnlich wie bei den Ergebnissen zum Glyphosattransport können die Resultate zur Nutzung von Glyphosat als Stickstoffquelle nur mit dem Abbau von 2-AEP verglichen werden. Die Nutzung von 2-AEP als Stickstoffquelle ist für *Pseudomonas aeruginosa* (LACOSTE und NEUZIL, 1969; LACOSTE et al., 1976) und für *Pseudomonas putida* (COOK et al., 1978) beschrieben worden. Der von COOK und Mitarbeitern untersuchte Stamm konnte 2-AEP

zusätzlich noch als Kohlenstoffquelle nutzen. Das Wachstum von *Pseudomonas putida* mit 2-AEP als Phosphor-, Stickstoff- und Kohlenstoffquelle führte wie bei *Arthrobacter* sp. GLP-1/Nit-1 zur nahezu vollständigen Freisetzung des organisch gebundenen Phosphors als Orthophosphat (COOK et al., 1978; diese Arbeit Abb. 27).

Als Ursache für das Wachstum von GLP-1/Nit-1 mit Glyphosat als Stickstoffquelle war eine Änderung in der Regulation der Glyphosat- oder Phosphataufnahme wahrscheinlich. Der Transport von Phosphat und Glyphosat bei GLP-1 und der Mutante GLP-1/Nit-1 wurde untersucht. Dazu wurden die K_m - und V_{max} -Werte für die Aufnahme beider Substrate nach Wachstum mit verschiedenen Phosphorquellen bestimmt.

Die Glyphosataufnahme beim Ausgangsstamm *Arthrobacter* sp. GLP-1 war weitgehend charakterisiert (PIPKE, 1984; diese Arbeit). Die Bestimmung der Phosphataufnahme bei *A. sp. GLP-1* brachte Ergebnisse, die Resultaten bei anderen Bakterien entsprechen. Nach Wachstum mit Glyphosat als Phosphorquelle war die Affinität und die maximale Aufnahmerate für Phosphat sehr hoch (K_m 1,6 μM , V_{max} 2,8 $\mu Mol/min \cdot mg$, Abb. 30). Mit Phosphat als Phosphorquelle ist die Affinität etwas geringer, die Aufnahmerate dagegen deutlich reduziert (K_m 8,7 μM , V_{max} 0,17 $nMol/min \cdot mg$, Abb. 31). Die Regulation der Phosphataufnahme bei *A. sp. GLP-1* entspricht damit prinzipiell der Regulation bei *Escherichia coli* K-12. *E. coli* besitzt ein konstitutives Phosphattransportsystem mit geringer Affinität und ein hochaffines induzierbares Phosphattransportsystem (ROSENBERG et al., 1977; WILLSKY und MALAMY, 1980; SURIN et al., 1985). Der Phosphattransport der Mutante GLP-1/Nit-1 unterscheidet sich extrem von den Ergebnissen, die für GLP-1 und *E. coli* bestimmt wurden. Nach Wachstum mit Glyphosat als Phosphor- und Stickstoffquelle ist der K_m -Wert für die Phosphataufnahme 590 μM und der V_{max} -Wert 1,8 $nMol/min \cdot mg$ (Abb. 32). Verglichen mit dem Ausgangsstamm ist das eine ca. 300 fache Verringerung der Affinität und eine mehr als 1500 fache Reduktion der maximalen Aufnahmerate. Mit Phosphat als Phosphorquelle ändern sich die Parameter für die Phosphataufnahme kaum (K_m 830 μM , V_{max} 2,2 $nMol/min \cdot mg$, Abb. 33). Die Ergebnisse der Phosphataufnahme von GLP-1/Nit-1 deuten darauf hin, daß der mutierte Stamm nur ein konstitutives Aufnahmesystem für Phosphat hat, dessen Affinität verglichen mit dem Ausgangsstamm drastisch reduziert ist. Im Gegensatz zur Phosphataufnahme ist die Glyphosataufnahme bei *A. sp. GLP-1/Nit-1* nicht geändert. Die K_m -Werte für die Aufnahme des Herbizids sind 105 μM nach Wachstum mit Phosphat als Phosphorquelle und 120 μM nach Wachstum mit Glyphosat als Phosphor- und Stickstoffquelle (Abbn. 34,35). Der K_m -Wert für die Glyphosataufnahme bei *A. sp. GLP-1* ist 125 μM . Die Aufnahmerate für Glyphosat ist bei der Mutante GLP-1/Nit-1 nach Wachstum mit Phosphat als Phosphorquelle dreimal höher als mit Glyphosat. Eine geringe Erhöhung der Aufnahmerate wurde auch bei Aufnahmekinetiken (Abb. 29), die nach Wachstum mit verschiedenen Phosphor- und Stickstoffquellen gemessen wurden, beobachtet. Die geringere Affinität des mutierten Stamms zu Phosphat deutet schon auf Unterschiede bei der Hemmung der Glyphosataufnahme durch Phosphat hin. Aus den Ergebnissen zur Bestimmung des K_j -Wertes für Phosphat (Abbn. 35-37) geht hervor, daß die Affinität von Phosphat zum Glyphosataufnahmesystem bei GLP-1/Nit-1 um zwei Größenordnungen geringer ist, als beim Ausgangsstamm GLP-1. Der K_j -Wert von 2,3 mM bei GLP-1/Nit-1 macht deutlich, daß die Glyphosataufnahme durch die

Mutante selbst bei millimolaren Phosphatkonzentrationen nicht völlig gehemmt wird. Im Gegensatz dazu steht der K_i -Wert von GLP-1, der mit 24 μM eine so hohe Affinität zum Aufnahmesystem von Glyphosat hat, daß millimolare Phosphatkonzentrationen die Aufnahme des Herbizids vollständig hemmen. Bei beiden Bakterienstämmen ist die Hemmung der Glyphosataufnahme durch Phosphat kompetitiv.

Wie in der Diskussion ausführlich dargelegt wurde, führte die Fähigkeit von *A. sp.* GLP-1/Nit-1 das Herbizid Glyphosat als Stickstoffquelle zu nutzen zu einer verringerten Affinität für Phosphat. Bei Wachstum mit suboptimalen Phosphatkonzentrationen (Abb. 38) wird der Nachteil dieser zusätzlichen Stoffwechselleistung offensichtlich. Die verringerte Affinität zu Phosphat bedingt eine längere lag-Phase und eine verlängerte Generationszeit, wenn die angebotene Phosphatkonzentration unter die Konzentration des K_m -Wertes fällt. Unter nicht selektiven Bedingungen (in Abwesenheit von Glyphosat) hat daher das Phosphataufnahmesystem von *Arthrobacter sp.* GLP-1/Nit-1 einen bedeutenden negativen Selektionswert. Ähnliche Befunde für die glyphosatresistente EPSP-Synthase aus *Klebsiella pneumoniae* (SCHULZ, 1986) und für herbizidresistente Organismen im allgemeinen (GRESSEL, 1984) bestätigen, daß resistente Organismen in Abwesenheit des Herbizids eine geringere Fitness haben, als die entsprechenden Wildtypen.

Die Suche nach einem glyphosatabbauenden Enzym (C-P Lyase) bzw. die Isolierung des für ein solches Enzym kodierenden Gens ist ein möglicher Ansatz, Glyphosatresistenz in Kulturpflanzen zu übertragen. Die Untersuchungen zum Abbau des Herbizids durch Bakterien sind in diesem Zusammenhang zu sehen.

Ein Ansatz, der in der Zwischenzeit zur Erzeugung von Glyphosatresistenz sehr weit entwickelt wurde, ist die Übertragung einer glyphosatresistenten EPSP-Synthase in Pflanzen. COMAI et al. (1985) transformierten Tabakzellen mit der glyphosatresistenten EPSP-Synthase aus *Salmonella thyphimurium* und konnten die Expression des bakteriellen Gens demonstrieren. Der Grad der erreichten Glyphosattoleranz war nicht hoch. Die Ursache für die geringe Toleranz ist wahrscheinlich die Kompartimentierung der EPSP-Synthase in Chloroplasten (MOUSDALE und COGGINS, 1985; JOHÄNNING, 1987). DELLA CIOPPA et al. (1986) sowie HOLLÄNDER-CZYTKO und AMRHEIN (1987) konnten für die EPSP-Synthasen aus *Petunia hybrida* bzw. *Corydalis sempervirens* zeigen, daß die EPSP-Synthase als Prä-Form mit einem höheren Molekulargewicht synthetisiert wird. Neben dem reifen Enzym beinhaltet die Prä-Form ein Peptid, welches den gerichteten Transport der EPSP-Synthase in Plastiden gewährleistet. Die von COMAI et al. (1985) übertragene EPSP-Synthase aus *S. thyphimurium* hatte kein Transportpeptid und konnte nur im Cytosol exprimiert werden. Die Bedeutung des Transportpeptids bestätigten SHAH et al. (1986), die *Petunia* Zellen mit einem chimären Konstrukt aus der EPSP-Synthasesequenz einschließlich Transportpeptid und einem viralen Promotor transformierten. Zur Transformation benutzten sie die EPSP-Synthase aus einer überproduzierenden Zelllinie von *Petunia*. Transformierte Zellen und aus den Zellen regenerierte transgene Pflanzen waren glyphosattolerant. In einer kürzlich erschienen Arbeit berichten FILLATTI et al. (1987) über eine effiziente Transformation von Tomaten mit dem bakteriellen EPSP-Synthase-Gen aus *S. thyphimurium* und einer erhöhten Glyphosat-toleranz durch die Expression des resistenten Enzyms. Transformierte regenerierte

Pflanzen konnten in Gegenwart von Glyphosatmengen, die üblicherweise auf Feldern angewendet werden, wachsen.

Verglichen mit den Ergebnissen, die mit der Transformation von Pflanzen mit resistenten oder überproduzierten EPSP-Synthasen erreicht wurden, befinden sich die Arbeiten über die Transformation von Pflanzen mit einem glyphosatabbauenden Enzym noch im Anfangsstadium. Trotzdem sind gute Fortschritte in dieser Richtung zu erwarten. Die Transformation von *Arthrobacter* ist ebenso beschrieben worden (ROBERTS et al., 1987) wie die Klonierung eines Gens in *E. coli*, welches für den Abbau von Organophosphonaten (aber nicht für Glyphosat) verantwortlich ist (LOO et al., 1987). Ein Ansatz für die molekulargenetische Analyse der C-P Lyase ist die Frage, ob dieses Enzym durch ein Plasmid oder durch das bakterielle Chromosom kodiert ist. In diesem Zusammenhang ist die Charakterisierung eines *Arthrobacter* Stammes, der das Herbizid *s*-Ethyl-*N,N*-Dipropylthiocarbamate (EPTC) als Kohlenstoffquelle nutzen kann, von Interesse (TAM et al., 1987). Erste Ergebnisse deuten auf einen plasmidassoziierten Abbau von EPTC hin.

Auch der Nachweis der C-P Lyase *in vitro* scheint durch die Anwendung molekular-genetischer Methoden möglich. Die Labilität einer Quecksilber-Kohlenstoff (Hg-C) Lyase in zellfreien Extrakten von *Escherichia coli* war Anlaß für die Clonierung und Amplifikation des entsprechenden Gens durch BEGLEY et al. (1986). Die Autoren konstruierten einen überproduzierenden *E. coli* Stamm und erhielten einen Hg-C Lyaseanteil von 3 % aller löslichen Proteine. Mit diesem überproduzierenden Stamm war die Reinigung des Enzyms bis zur Homogenität möglich.

Die Erzeugung von Herbizidresistenz in Kulturpflanzen durch Transformation mit Enzymen, die das Herbizid verstoffwechseln können, ist generell möglich. Die Resistenz von Kartoffel-, Tomaten- und Tabakpflanzen gegen das nicht selektive Herbizid Phosphinothricin durch die Expression einer Phosphinothricin-Acetyltransferase aus *Streptomyces* (DE BLOCK et al., 1987) dokumentiert eindrucksvoll die Möglichkeiten eines solchen Systems.

VI. Zusammenfassung

1. Der Abbau des Herbizids Glyphosat (N-(Phosphonomethyl)glycin) durch Bakterien der Gattung *Arthrobacter* wurde untersucht. Nach Selektion auf Medien mit Glyphosat als einziger Phosphorquelle konnte ein Bakterienstamm isoliert werden, der durch physiologische und morphologische Merkmale als *Arthrobacter* Species identifiziert wurde. Der isolierte Stamm, *Arthrobacter* sp. GLP-1, kann neben Glyphosat 19 weitere Phosphonverbindungen (Alkyl- und Aminophosphonsäuren, Komplexbildner sowie Antibiotika) als Phosphorquelle nutzen.

2. Von neun getesteten *Arthrobacter* Stämmen kann außer *A. sp. GLP-1* noch *Arthrobacter atrocyaneus* Glyphosat als Phosphorquelle nutzen. *A. atrocyaneus* ist der erste glyphosatabbauende Bakterienstamm, der nicht nach Selektion isoliert wurde. Das Bakterium wurde einer Stammsammlung entnommen und war vor den Versuchen nicht mit dem Herbizid in Kontakt. *A. atrocyaneus* hat im Gegensatz zu *A. sp. GLP-1* eine glyphosatsensitive EPSP-Synthase (50 % Hemmung der EPSP-Synthase im Rohextrakt bei 0,2 mM Glyphosat; spez. Aktivität 0,47 nKat/mg) und scheidet unter Glyphosateinfluß Shikimisäure 3-Phosphat in das Kulturmedium aus. Außer Glyphosat kann *A. atrocyaneus* nur Aminomethylphosphonsäure und 1-Aminobutylphosphonsäure als Phosphorquelle nutzen. Die Glyphosatkonzentrationen, die bei den übrigen *Arthrobacter* Stämmen eine halbmaximale Hemmung der EPSP-Synthase bewirken, variieren um zwei Größenordnungen. Auch die Ausscheidung von Shikimisäure und Shikimisäure 3-Phosphat unter Glyphosateinfluß ist unterschiedlich.

3. Der Stamm *Arthrobacter sp. GLP-1* baut Glyphosat über Sarcosin (N-(Methyl)glycin) als erstes Produkt ab. Die Aktivität einer für eine solche Spaltung nötigen C-P Lyase konnte zellfrei nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte ein *in vivo* System zum Nachweis der C-P Lyase etabliert werden. Das System wurde durch Permeabilisierung der Bakterien mit Dimethylsulfoxid verbessert. Der K_m -Wert der Reaktion ist 61 μ M mit einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von 2,2 pMol/sec·mg Protein. Durch radioanalytische Methoden konnte außerdem der weitere Abbau von Sarcosin durch das Enzym Sarcosin-Oxidase nachgewiesen werden. Bei der Sarcosin-Oxidase Reaktion entstehen Glycin und ein C₁-Fragment, welches unter Beteiligung von Tetrahydrofolsäure über Standardstoffwechselwege metabolisiert wird.

4. Der Abbau von Glyphosat durch *Arthrobacter atrocyaneus* erfolgt über die intermediäre Bildung von Aminomethylphosphonsäure und unterscheidet sich grundlegend vom Glyphosatstoffwechsel in *A. sp. GLP-1*. Aminomethylphosphonsäure wird beim weiteren Abbau zu Ammoniumstickstoff, Kohlendioxid und Phosphat mineralisiert.

5. Die Aufnahme von Glyphosat durch *Arthrobacter* sp. GLP-1 wurde charakterisiert. Die Aufnahme des Herbizids wird durch Phosphat und Phosphatester im Kulturmedium reprimiert. Die Inkubation von Bakterien ohne Phosphorquelle im Kulturmedium führt zur Induktion des Glyphosataufnahmesystems. Diese Induktion ist abhängig von Proteinbiosynthese. Glyphosat wird bevorzugt als Dianion aufgenommen. Die Aufnahme ist nicht mit der Stabilität von Glyphosat-Metallkomplexen korreliert. Die Glyphosataufnahme und die Spaltung der C-P Bindung sind zwei voneinander getrennte Prozesse.

6. Nach Mutagenese von *Arthrobacter* sp. GLP-1 konnte erstmalig ein Stamm (GLP-1/Nit-1) selektiert werden, der das Herbizid Glyphosat als Stickstoffquelle nutzt. Der Abbau von Glyphosat als Stickstoffquelle bedingt ein langsames Wachstum und die Freisetzung von Phosphatmengen, die den aufgenommenen und abgebauten Glyphosatmengen entsprechen.

7. Die Ursache für die Glyphosataufnahme von *A. sp.* GLP-1/Nit-1 in Gegenwart hoher Phosphatkonzentrationen ist eine verringerte Affinität des mutierten Stamms zu Phosphat. Der Ausgangsstamm GLP-1 besitzt ein konstitutives und ein induzierbares Phosphataufnahmesystem. Der mutierte Stamm hat nur noch ein konstitutives Phosphataufnahmesystem mit einer im Vergleich zu GLP-1 um zwei Größenordnungen verringerten Affinität zu Phosphat.

8. Die Affinität zu Glyphosat ist bei beiden Stämmen identisch. Der K_i -Wert für die Hemmung der Glyphosataufnahme durch Phosphat ist beim Ausgangsstamm GLP-1 24 μM und beim mutierten Stamm GLP-1/Nit-1 2,3 mM. Die Verringerung der Affinität zu Phosphat bei *A. sp.* GLP-1/Nit-1 führt zu einer Verlangsamung des Wachstums bei suboptimalen Phosphatkonzentrationen.

VII. Literatur

- ALLEN, J. G., F. R. ATHERTON, M. J. HALL, C. H. HASSALL, S. W. HOLMES, R. W. LAMBERT, L. J. NISBET und P. S. RINGROSE. 1978.
Phosphonopeptides, a new class of synthetic antibacterial agents.
Nature. 272: 56-58.
- AMRHEIN, N. und P. FILNER. 1973.
Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate in *Chlamydomonas reinhardtii*: Isolation and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 70: 1099-1103.
- AMRHEIN, N., D. JOHÄNNING, J. SCHAB und A. SCHULZ. 1983.
Biochemical basis for glyphosate-tolerance in a bacterium and a plant tissue culture. *FEBS Lett.* 157: 191-196.
- AMRHEIN, N. 1986.
Specific inhibitors as probes into the biosynthesis and metabolism of aromatic amino acids. *Rec. Adv. Phytochem.* 20: 83-117.
- BALTHAZOR, T. M. und L. E. HALLAS. 1986.
Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 432-434.
- BAIRD, D. D., R. P. UPCHURCH, W. B. HOMESLEY und J. E. FRANZ. 1971.
Introduction of a new broad spectrum postemergence herbicide class with the utility for herbaceous perennial weed control.
Proc. North Cent. Weed Cont. Conf. 26: 64-68.
- BARMAN, T. E. 1969.
Enzyme Handbook vol. 1. Springer Verlag, New York Inc: 193.
- BAYER, E., K. H. GUGEL, K. HÄGELE, H. HAGENMAIER, S. JESSIPOW, W. A. JÖNIG und H. ZÄHNER. 1972.
Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Phosphinothricin und Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin. *Helv. Chim. Acta.* 55: 224-239.
- BEGLEY, T. P., A. E. WALTZ und C. T. WALSH. 1986.
Bacterial Organomercurial Lyase: Overproduction, isolation, and characterization. *Biochemistry*. 25: 7186-7192.
- BLACKBURN, G. M. 1981.
Phosphonates as analogues of biological phosphates.
Chemistry and Industry. 1981: 134-138.

- BOUSFIELD, I. J., R. M. KEDDIE, T. R. DANDO und S. SHAW. 1985.
Simple rapid methods of cell wall analysis as an aid in the identification of aerobic coryneform bacteria. In M. GOODFELLOW und S. M. MINNIKIN (eds.), Chemical methods in bacterial systematics. Academic Press, London. 221-236.
- BRADFORD, M. M. 1976.
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- BRECKE, B. J. und W. B. DUKE. 1980.
Effect of glyphosate on intact bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and isolated cells. Plant Physiol. 66: 656-659.
- BURTON, J. D. und N. E. BLAKE. 1986.
Evidence for carrier-mediated transport of glyphosate into suspension cultured potato cells. Abstract No. 3D-07, IUPAC, Ottawa.
- CARLTON, B. C. und B. J. BROWN. 1981.
Gene mutation. In P. GERHARDT (ed.), Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 222-229.
- CHAVANE, M. V. 1947.
Synthese de quelques acides phosphonique amines de formule generale $H_3N^+-(CH_2)_n-PO_3^-H$. Compt. Rend. 224: 406.
- COMAI, L., L. C. SEN, und D. M. STALKER. 1983.
An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. Science. 221: 370-371.
- COMAI, L., D. FACCIOOTTI, W. R. HIATT, G. THOMPSON, R. E. ROSE und D. M. STALKER. 1985.
Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella thyphimurium* confers tolerance to glyphosate. Nature. 317: 741-744.
- CORDEIRO, M. L., D. L. POMPLIANO und J. W. FROST. 1986.
Degradation and detoxification of organophosphonates: Cleavage of the carbon to phosphorus bond. J. Am. Chem. Soc. 108: 332-334.
- COOK, A. M., C. D. DAUGHTON und M. ALEXANDER. 1978.
Phosphonate utilization by bacteria. J. Bacteriol. 133: 85-90.
- CURE, G. L. und R. M. KEDDIE. 1973.
Methods for the morphological examination of aerobic coryneform bacteria. In R. G. BOARD und D. W. LOVELOCK (eds.), Sampling-microbiological monitoring of environments. Academic Press, London. 123-135.

DAUGHTON, C. G., A. M. COOK und M. ALEXANDER. 1979.

Phosphate and soil binding: Factors limiting bacterial degradation of ionic phosphorus-containing pesticide metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 605-609.

DE BLOCK, M., J. BOTTERMAN, M. VANDEWIELE, J. DOCKX, C. THOEN, V. GOSSELE, N. RAO MOVVA, C. THOMPSON, M. VAN MONTAGU und J. LEEMANS. 1987.

Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6: 2513-2518.

DELLA-CIOPPA, G., S. C. BAUER, B. K. KLEIN, C. S. GASSER, N. E. TUMER, D. M. SHAH, R. T. FRALEY und G. M. KISHORE. 1986.

Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Plant Physiol.* 80: 127-133.

DIFCO MANUAL. 1972.

9 th edn., Difco Laboratories, Detroit, Mich: 251.

DONN, G., E. TISCHER, J. A. SMITH und H. M. GOODMAN. 1984.

Herbicide-resistant alfalfa cells: An example of gene amplification in plants. *J. Mol. Appl. Genet.* 2: 621-635.

DRAKE, G. L. Jr. und T. A. CALAMARI Jr. 1983.

Industrial uses of phosphonates. In R. L. HILDERBRAND (ed.), The role of phosphonates in living systems. CRC Press, Boca Raton, Fla. 171-194.

DUNCAN, K., A. LEWENDON und J. R. COGGINS. 1984.

The complete amino acid sequence of *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase. *FEBS Lett.* 170: 59-63.

FILLATTI, J. J., J. KISER, R. ROSE und L. COMAI. 1987.

Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology.* 5: 726-730.

FINKELSTEIN, J. 1946.

The preparation of β -aminoethanephosphonic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 68: 2397-2398.

FOLWACZNY, B. 1986.

Isolierung und Charakterisierung Glyphosat-resistenter *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

FRANZ, J. E. 1979.

Glyphosate and related chemistry. In H. GEISSBÜHLER (ed.), Advances in pesticide science. Part 2. Pergamon Press, Oxford and New York. 139-147.

FROST, J. W., S. LOO, M. L. CORDEIRO und D. LI. 1987.

Radical-based dephosphorylation and organophosphonate biodegradation.
J. Am. Chem. Soc. 109: 2166-2171.

GRESSEL, J. 1984.

Biotechnologically conferring herbicide resistance in crops: The present realities.
In L. VAN VLOTEN-DOTING (ed.), Molecular form and function of the plant genome.
Plenum, New York. 489-504.

HARKNESS, D. R. 1966.

Bacterial growth on aminoalkylphosphonic acids.
J. Bacteriol. 92: 623-627.

HENDLIN, D., E. O. STAPLEY, M. JACKSON, H. WALLICK, A. K. MILLER, F. J. WOLF,
T. W. MILLER, L. CHAIET, F. M. KAHAN, E. L. FOLTZ, H. B. WOODRUFF, J. M.
MATA, S. HERNANDEZ und S. MOCHALES. 1969.

Phosphonomycin, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*.
Science. 166: 122-123.

HOLLÄNDER, H., H.-H. KILTZ und N. AMRHEIN. 1979.

Interference of L- α -aminoxy- β -phenylpropionic acid with phenylalanine metabolism
in buckwheat. Z. Naturforsch. 34 c: 1162-1173.

HOLLÄNDER-CZYTKO, H. und N. AMRHEIN. 1983.

Subcellular compartmentation of shikimic acid and phenylalanine in buckwheat cell
suspension cultures grown in the presence of shikimate pathway inhibitors.
Plant Sci. Lett. 29: 89-96.

HOLLÄNDER-CZYTKO, H. und N. AMRHEIN. 1987.

5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase, the target enzyme of the herbicide
glyphosate, is synthesized as a precursor in a higher plant.
Plant Physiol. 83: 229-231.

HORI, T., O. ITASAKE, H. INOUE und K. YAMADA. 1964.

Further study of structural components of the pyridine insoluble sphingolipid from
Corbicula, *Corbicula sandai* and the distribution in other species.
J. Biochem. 56: 477-479.

HORIGUCHI, M. und M. KANDATSU. 1959.

Isolation of 2-aminoethane phosphonic acid from rumen protozoa.
Nature. 184: 901.

HORIGUCHI, M. 1972.

Biosynthesis of 2-aminoethylphosphonic acid in cell-free preparations of
Tetrahymena. Biochim. Biophys. Acta. 261: 102-113.

- HORIUCHI, T., S. HORIUCHI und D. MIZUNO. 1959.
A possible negative feedback phenomenon controlling formation of alkaline phosphomonoesterase in *Escherichia coli*. *Nature*. **183**: 1529-1530.
- JACOB, G. S., J. SCHAEFER, E. O. STEJSKAL und R. A. MCKAY. 1985.
Solid-state NMR determination of glyphosate metabolism in a *Pseudomonas* sp.
J. Biol. Chem. **260**: 5899-5905.
- JAWORSKI, E. G. 1972.
The mode of action of N-phosphonomethylglycine: Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* **20**: 1195-1198.
- JOHÄNNING, D. 1987.
Molekulare Grundlagen der Glyphosatoleranz einer pflanzlichen Zellkultur von *Corydalis sempervirens*. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.
- JONES, D. und M. D. COLLINS. 1986.
Irregular, nonsporing Gram-positive rods. In P. H. A. SNEATH (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1261-1301.
- KISHORE, G. M. und G. S. JACOB. 1987.
Degradation of glyphosate by *Pseudomonas* sp. PG 2982 via a sarcosine intermediate. *J. Biol. Chem.* **262**: 12164-12169.
- KONDO, Y., T. SHOMURA, Y. OGAWA, T. TSURUOKA, H. WATANABE, K. TOTSUKAWA, T. SUZUKI, C. MORIYAMA, J. YOSHIDA, S. INOUE und T. NIIDA. 1973.
Studies on a new antibiotic SF-1293. I. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293.
Sci. Reports of Meiji Seika Kaisha. **13**: 34-41.
- KORNBERG, H. L. und R. E. REEVES. 1972.
Correlation between hexose transport and phosphotransferase activity in *Escherichia coli*. *Biochem J.* **126**: 1241- 1243.
- KUHN, D. A. und M. P. STARR. 1956.
Production of the blue pigment indigoidine by a new *Arthrobacter* sp.
Bact. Proc. **1956**: 58-59.
- LAATSCH, H. 1979.
Identifizierung seltener Aminosäuren durch Mikrodansylierung.
J. Chromatogr. **173**: 398-402.

LACOSTE, A. M. und E. NEUZIL. 1969.

Transamination de l'acide amino-2-ethylphosphonique par *Pseudomonas aeruginosa*.
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 269 D: 254-257.

LACOSTE, A. M., A. CASSAIGNE, M. TAMARI und E. NEUZIL. 1976.

Transport de l'acide amino-2-ethylphosphonique chez *Pseudomonas aeruginosa*.
Biochimie. 58: 703-712.

LA NAUZE, J. M., H. ROSENBERG und D. C. SHAW. 1970.

The enzymatic cleavage of the carbon-phosphorus bond: Purification and properties of phosphonate. Biochim. Biophys. Acta. 212: 332-350.

LANZETTA, P. A., L. J. ALVAREZ, P. S. REINACH und D. A. CANDIA. 1979.

An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate.
Anal. Biochem. 100: 95-97.

LEASON, M., D. CUNLIFFE, D. PARKIN, P. J. LEA und B. J. MIFLIN. 1982.

Inhibition of pea leaf glutamine synthetase by methionine sulfoximine, phosphinothricin, and other glutamate analogues. Phytochem. 21: 855-857.

LEVITT, G., H. L. PLOEG, R. C. WEIGEL Jr. und D. J. FITZGERALD. 1981.

2-Chloro-N((4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)aminocarbonyl)-benzene-sulfonamide, a new herbicide. J. Agric. Food. Chem. 29: 416-424.

LINSMAIER, E. M. und F. SKOOG. 1965.

Organic growth factor requirement of tobacco tissue cultures.
Physiol. Plantarum. 19: 110-127.

LOO, S. H., N. K. PETERS und J. W. FROST. 1987.

Genetic characterization of an *Escherichia coli* mutant deficient in organophosphonate biodegradation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 148: 148-152.

MASTALERZ, P. 1959.

Inhibition of glutamine synthetase by phosphonic analogues of glutamic acid.
Arch. Immunol. Therap. Dosw. 7: 201-210.

MOORE, J. H., H. D. BRAYMER und A. D. LARSON. 1983.

Isolation of a *Pseudomonas* sp. which utilizes the phosphonate herbicide glyphosate.
Appl. Environ. Microbiol. 46: 316-320.

MOUSDALE, D. M. und J. R. COGGINS. 1985.

Subcellular localisation of the common shikimate-pathway enzymes in *Pisum sativum* L. Planta. 163: 241-249.

MOTEKAITIS, R. J. und A. E. MARTELL. 1985.

Metal chelate formation by N-phosphonomethylglycine and related ligands.
J. Coord. Chem. **14**: 139-149.

NAFZIGER, E. D., J. M. WIDHOLM, H. C. STEINRÜCKEN und J. L. KILLMER. 1984.

Selection and characterization of a carrot cell line tolerant to glyphosate.
Plant Physiol. **76**: 571-574.

NASH, T. 1953.

The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction.
Biochem. J. **55**: 416-421.

PIPERNO, J. R. und D. L. OXENDER. 1968.

Amino acid transport systems in *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **243**: 5914-5920.

PIPKE, R. 1984.

Der Abbau der Herbizids Glyphosat durch Bakterien.
Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

PIPKE, R., N. AMRHEIN, G. S. JACOB, J. SCHAEFER und G. M. KISHORE. 1987 (a).

Metabolism of glyphosate in an *Arthrobacter* sp. GLP-1.
Eur. J. Biochem. **165**: 267-273.

PIPKE, R., A. SCHULZ und N. AMRHEIN. 1987 (b).

Uptake of glyphosate by an *Arthrobacter* sp.
Appl. Environ. Microbiol. **53**: 974-978.

PUTNAM, A. R. 1976.

Fate of glyphosate in deciduous fruit trees.
Weed Sci. **24**: 425-430.

REYNOLDS, E. S. 1963.

The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. **17**: 208-212.

ROBERTS, A. N., L. BARNETT und S. BRENNER. 1987.

Transformation of *Arthrobacter* and studies on the transcription of the *Arthrobacter* *ermA* gene in *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*.
Biochem. J. **243**: 431-436.

ROGERS, S. G., L. A. BRAND, S. B. HOLDER, E. S. SHARPS und M. J. BRACKIN. 1983.

Amplification of the *aroA* gene from *Escherichia coli* results in tolerance to the herbicide glyphosate. Appl. Environ. Microbiol. **46**: 37-43.

ROSENBERG, H. und J. M. LA NAUZE. 1967.

The metabolism of phosphonates by microorganisms. The transport of aminoethyl-phosphonic acid in *Bacillus cereus*. Biochim. Biophys. Acta. 141: 79-80.

ROSEBERG, H., R. G. GERDES und K. CHEGWIDDEN. 1977.

Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 131: 505-511.

ROUSER, G., G. KRITCHEVSKY, D. HELLER und E. LIEBER. 1963.

Lipid composition of beef brain, beef liver, and sea anemone: Two approaches to quantitative fractionation of complex lipid mixtures. J. Am. Oil Chem. Soc. 40: 425-454.

RUEPPEL, M. L., B. B. BRIGHTWELL, J. SCHAEFER und J. T. MARVEL. 1977.

Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. J. Agric. Food Chem. 25: 517-528.

SCHULZ, A., D. SOST und N. AMRHEIN. 1984.

Insensitivity of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase to glyphosate confers resistance to this herbicide in a strain of *Aerobacter aerogenes*. Arch. Microbiol. 137: 121-123.

SCHULZ, A., A. KRÜPER und N. AMRHEIN. 1985.

Differential sensitivity of bacterial 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. FEMS Microbiol. Lett. 28: 297-301.

SCHULZ, A. 1986.

Biochemische Grundlagen der Glyphosatresistenz in Bakterien. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum.

SHAH, D. M., R. B. HORSCH, H. J. KLEE, G. M. KISHORE, J. A. WINTER, N. E. TUME, C. M. HIRONAKA, P. R. SANDERS, C. S. GASSER, S. AYKENT, N. R. SIEGEL, S. R. ROGERS und R. T. FRALEY. 1986.

Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science. 233: 478-481.

SHANER, D. L., P. C. ANDERSON und M. A. STIDHAM. 1984.

Imidazolinones. Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. Plant Physiol. 76: 545-546.

SHINABERGER, D. L. und H. D. BRAYMER. 1986.

Glyphosate catabolism by *Pseudomonas* sp. strain PG 2982. J. Bacteriol. 168: 702-707.

SMITH, J. D. 1983.

Metabolism of phosphonates. In R. L. HILDERBRAND (ed.), The role of phosphonates in living systems. CRC Press, Boca Raton, Fla. 31-54.

SPURR, A. R. 1969.

A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.
J. Ultrastruct. Res. **26**: 31-43.

STALKER, D. M., W. R. HIATT und L. COMAI. 1985.

A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate.
J. Biol. Chem. **260**: 4724-4728.

STEINRÜCKEN, H. C. und N. AMRHEIN. 1980.

The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. **94**: 1207-1212.

STEINRÜCKEN, H. C. und N. AMRHEIN. 1984.

5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties. Eur. J. Biochem. **143**: 341-349.

STEINRÜCKEN, H. C., A. SCHULZ, N. AMRHEIN, C. A. PORTER und R. T. FRALEY. 1986.

Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate tolerant *Petunia hybrida* cell line. Arch. Biochem. Biophys. **224**: 169-178.

SURIN, B. P., H. ROSENBERG und G. B. COX. 1985.

Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: Nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. J. Bacteriol. **161**: 189-198.

SUZUKI, M. 1981.

Purification and some properties of sarcosine oxidase from *Corynebacterium* sp. U-96. J. Biochem. **89**: 599-607.

TALBOT, H. W., L. M. JOHNSON und D. M. MUNNECKE. 1984.

Glyphosate utilization by *Pseudomonas* sp. and *Alcaligenes* sp. isolated from environmental sources. Curr. Microbiol. **10**: 255-260.

TAM, A. C., R. M. BEHKI und S. U. KAHN. 1987.

Isolation and characterization of an *s*-Ethyl-*N,N*-Dipropylthiocarbamate-degrading *Arthrobacter* strain and evidence for plasmid-associated *s*-Ethyl-*N,N*-Dipropylthiocarbamate degradation. Appl. Environ. Microbiol. **53**: 1088-1093.

TORRIANI, A. 1960.

Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. **38**: 460-469.

WACKETT, L. P., S. L. SHAMES, C. P. VENDITTI und C. T. WALSH. 1987.

Bacterial carbon-phosphorus lyase: Products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. J. Bacteriol. **169**: 710-717.

WALTER, K. und C. SCHÜTT. 1970.

Saure und alkalische Phosphatase im Serum. In H. U. BERGMAYER (ed.), Methoden der enzymatischen Analyse, 2nd ed., Verlag Chemie, Weinheim. 818-822.

WARREN, W. A. 1968.

Biosynthesis of phosphonic acids in *Tetrahymena*.

Biochim. Biophys. Acta. 156: 340-346.

WAUCHOPE, R. D. 1976.

Acid dissociation constants of arsenic acid, methylarsonic (MAA), dimethylarsinic acid (cacodylic acid), and N-(phosphonomethyl)glycine (glyphosate).

J. Agric. Food Chem. 24: 717-721.

WEIBENFELS, W. 1987.

Mikrobieller Abbau von Ethylendiamintetra(methylenphosphonsäure).

Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum.

WHITE, P. J., B. KELLY, A. SUFFLING und E. WORK. 1964.

Variation of activity of bacterial diaminopimelate decarboxylase under different conditions of growth. Biochem. J. 91: 600-610.

WILLSKY, G. R. und M. H. MALAMY. 1980.

Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 144: 356-365.

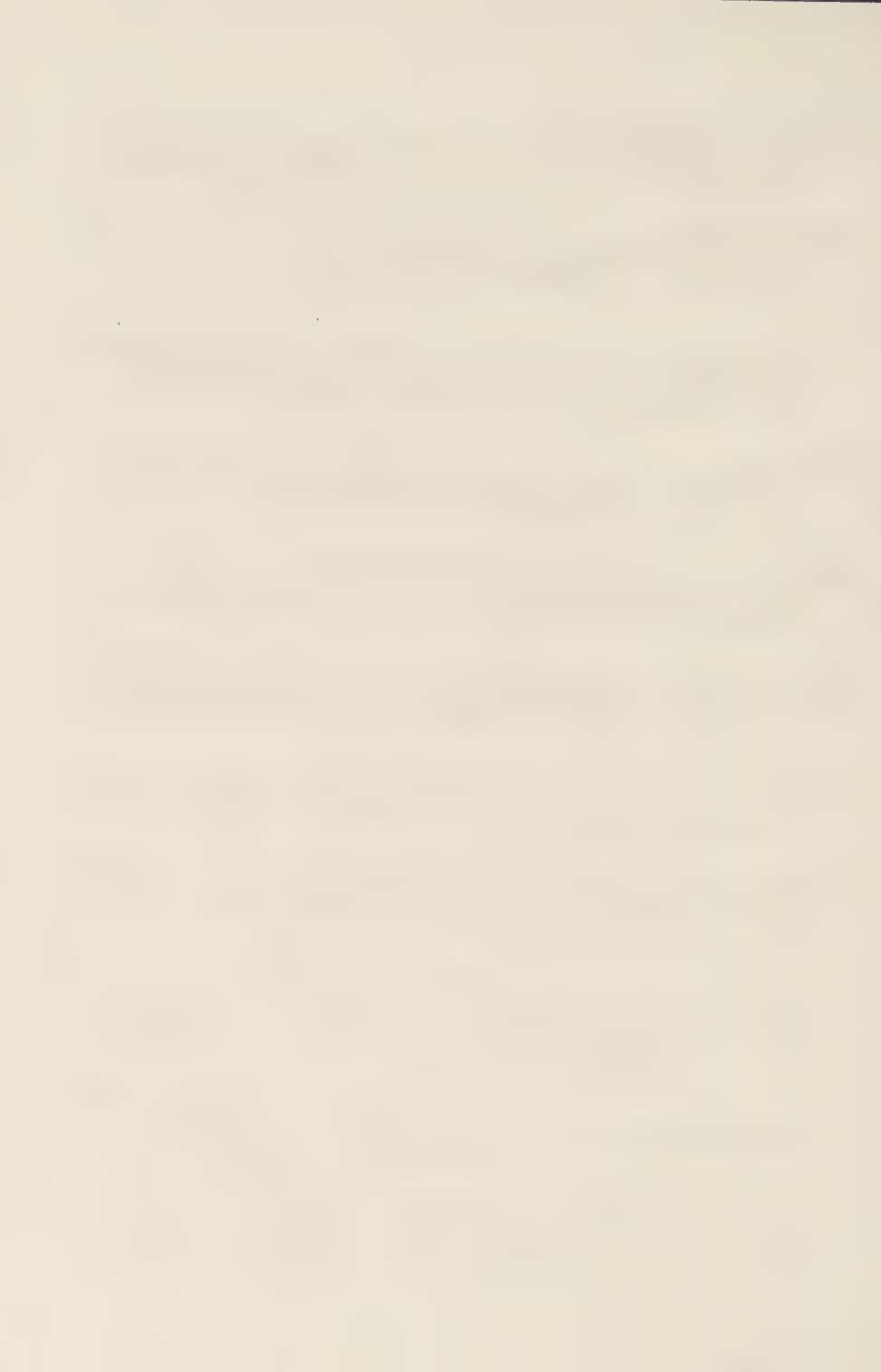
WINKLER, K. C. und P. G. DE HAAN. 1948.

On the action of sulfanilamide. XII. A set of noncompetitive sulfanilamide antagonists for *Escherichia coli*. Arch. Biochem. 18: 97-107.

ZELEZNICK, L. D., T. C. MEYERS und E. B. TITCHENER. 1963.

Growth of *Escherichia coli* on methyl- and ethylphosphonic acids.

Biochim. Biophys. Acta. 78: 546-547.



An dieser Stelle möchte ich Herrn Clemens Mollenhauer für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie und Herrn Hubert Winking für die Erstellung der Zeichnungen und Photos danken.

Mein persönlicher Dank gilt Prof. Dr. N. Amrhein für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine freundliche Unterstützung.

Lebenslauf

21. Mai 1958	geboren in Dortmund
1965-1968	Besuch der Grundschule an der Schillerstraße in Castrop-Rauxel
1969-1977	Besuch des Adalbert-Stifter-Gymnasiums in Castrop-Rauxel, Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife im Juni 1977
1977-1979	Bundeswehr
1979-1985	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum, Abschluß im Januar 1985 mit dem akademischen Grad Diplom-Biologe
seitdem	wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie und seit April 1985 Anfertigung der Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. N. Amrhein.

